



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS
MUTACIONES PATOLÓGICAS EN EL FACTOR
DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS HUMANO
(hAIF) SOBRE SUS FUNCIONES CELULARES:
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

*Comparative study of different pathological mutations in the human
apoptosis inducing factor (hAIF) on their cellular functions:
Bibliographic Review*

AUTOR

ALEJANDRO AZNAR CASADO

DIRECTORAS

RAQUEL MORENO LOSHUERTOS

PATRICIA FERREIRA NEILA

GRUPO GENOXPHOS

GRUPO FLAVOENZIMAS: MECANISMOS DE ACCIÓN Y BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

ABREVIATURAS

AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i> // factor de inducción de apoptosis
AIFM1/2/3	<i>Apoptosis-inducing factor mitochondria-associated 1/2/3</i>
Akt	Proteína quinasa B
ATP	Adenín trifosfato
CI/CII/CIII/CIV/CV	Complejo I/II/III/IV/V
CTC	Complejo de transferencia de carga
CHCH	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix</i>
CHCHD1	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 1</i>
CHCHD4	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 4</i>
COWCK	Síndrome de Cowchock
COXPD6	Deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa 6
C-terminal	Carboxilo terminal
CypA	Ciclofilina A
DFNX5	Sordera ligada al cromosoma X 5
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF3G	Factor traduccional de iniciación eucariota 3G
endoG	Endonucleasa G
FAD	Flavín adenín dinucleótido
hAIF	<i>Human apoptosis-inducing factor</i> // factor de inducción de apoptosis humano
Hq	Harlequin
HSP70	Proteína de choque térmico 70
H2AX	Miembro X de la familia de histonas H2A
kDa	Kilodaltons
MGI	<i>Mouse Genomics Informatics</i>
MIF	Factor de inhibición de migración de macrófagos
MLS	Secuencia de localización mitocondrial
MPTP	<i>Membrane permeabilization transition pores</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
N-terminal	Amino terminal
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
PAR	Poli ADP-ribosa
PARP-1	Poli ADP-ribosa poliemrasa 1
PI3K	Fosfatidilinositol-3-fosfato quinasa
PTEN	Homólogo de la fosfatasa y la tensina
Redox	Reducción-oxidación
SEMDHL	Displasia espondiloepimetáfiseal ligada al cromosoma X con leucodistrofia hipomielínica
tAIF	<i>Truncated apoptosis-inducing factor</i> // factor de inducción de apoptosis truncado
TXN1	Tiorredoxina 1

Índice

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
3.	Objetivo	3
4.	Metodología.....	4
4.1	Búsqueda bibliográfica	4
4.1.1	Bases de datos generales	4
4.1.2	Bases de datos específicas.....	4
4.1.3	Selección crítica.....	5
4.1.4	Búsqueda inversa.....	5
4.2	Creación de una red de interacción	5
5.	Resultados y discusión	6
5.1	Papel biológico.....	6
5.1.1	AIF como oxidorreductasa mitocondrial	6
5.1.2	Papel de AIF en la homeostasis mitocondrial y celular	7
5.1.3	Papel del AIF en la muerte celular	8
5.1.4	Estudio proteómico e interactómico del AIF.....	10
5.2	Relación con la patología.....	10
5.2.1	Síndrome de Cowchock	11
5.2.2	Deficiencia combinada de fosforilación oxidativa 6	15
5.2.3.	Displasia espondiloepimetáfiseal ligada al cromosoma X.....	19
5.2.4	Sordera ligada al cromosoma X 5.....	20
5.2.5	Mutación T492H	20
5.3	Modelos animales.....	20
5.3.1	Ratón Harlequin.....	21
5.3.2	Mutante Δex7	21
5.3.3	Mutante ΔR200	21
6.	Conclusiones.....	22
7.	Referencias	22
8.	Anexo	26

1. Resumen

El factor de inducción de apoptosis humano (hAIF) es una flavoenzima mitocondrial con actividad oxidorreductasa, cuyo gen, *AIFM1*, está codificado en el cromosoma X, más concretamente, en el locus Xq25-26. Al traducirse la proteína, tiene que ser translocada a la mitocondria, donde se inserta en la membrana interna. hAIF posee un sitio de unión al cofactor, FAD, y dos sitios de unión a NADH. El NADH permite la reducción de hAIF y regula de forma alostérica la formación de complejos de transferencia de carga (CTC) y su dimerización. hAIF participa en el mecanismo de entrada en la mitocondria de la proteína CHCHD4, una chaperona que posibilita el plegamiento de ciertas proteínas mitocondriales a través de la formación de puentes disulfuro. hAIF también participa en la muerte celular programada independiente de caspasas o parthanatos, donde hAIF es proteolizado y liberado de la membrana interna de la mitocondria en respuesta a un daño en el DNA. hAIF interacciona con múltiples proteínas en el citoplasma que regulan su translocación al núcleo, donde induce la condensación y degradación de la cromatina.

Se han descrito en la bibliografía patologías mitocondriales debidas a mutaciones en el gen *AIFM1*. Los pacientes de estas enfermedades, con un patrón de herencia ligada al cromosoma X, presentan un fenotipo muy variable, que se caracteriza por una disfunción del sistema nervioso, lo que conlleva una neurodegeneración. El mecanismo molecular del funcionamiento de hAIF tanto a nivel fisiológico como patológico todavía no se comprende completamente. El uso de modelos animales de estas enfermedades permite el estudio del papel de la proteína y de su relación con las enfermedades mitocondriales

1. Abstract

The human apoptosis-inducing factor (hAIF) is a mitochondrial flavoenzyme with oxidoreductase activity. The gene encoding this protein, AIFM1, is located in the X chromosome, more precisely, in the Xq25-26 locus. When the protein is translated, it is imported to the mitochondria and it is inserted in the mitochondrial inner membrane, facing the intermembrane space. The protein has a FAD-binding site and two NADH-binding sites. NADH regulates allosterically hAIF charge transfer complexes and its dimerization. On the other hand, hAIF participates in the CHCHD4 import pathway. CHCHD4 is an intermembrane space chaperone which allows the correct folding of certain mitochondrial proteins through the formation of sulfur bonds. Furthermore, hAIF participates in caspase-independent cell death or parthanatos. In this process, hAIF is cleaved upon DNA damage and translocates to the cytoplasm, where it interacts with multiple proteins which regulate its nuclear translocation. Once in the nucleus, hAIF induces chromatin condensation and chromatinolysis.

There are different mitochondrial pathologies described in the literature that are caused by an AIFM1 mutation. These diseases have an X-linked mendelian inheritance, and patients present variable phenotypes, which are characterized by a dysfunction of the nervous system, leading to neurodegeneration. The molecular mechanisms of hAIF underlying physiology and disease are yet unclear. Animal models have been used to study these disorders and they might be useful in the complete characterization of hAIF function and its relation with mitochondrial pathologies.

2. Introducción

La mitocondria es un orgánulo membranoso de origen endosimbiótico que está presente en el citoplasma de la gran mayoría de células eucariotas. Se pueden distinguir diferentes elementos estructurales en la mitocondria. En primer lugar, está la membrana externa que se caracteriza por ser poco selectiva (1). Por otro lado, está la membrana interna, que es mucho más selectiva que la externa (1). En esta membrana interna se encuentran los complejos proteicos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). A partir de los productos formados en rutas catabólicas, se forma NADH y FADH₂, que van a aportar electrones a los complejos del sistema OXPHOS, que permiten generar un gradiente electroquímico entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana (2). Esta energía potencial favorece la formación de enlaces químicos de alta energía por parte de la ATP sintasa (complejo V), facilitando la síntesis de ATP (2).

En este contexto, la proteína humana *apoptosis-inducing factor* (hAIF) es una flavoproteína mitocondrial con actividad oxidorreductasa codificada por el gen *AIFM1*, localizado en el cromosoma X, que permite el ensamblado de los complejos del sistema OXPHOS (3,4). Se han descrito otras dos isoformas de hAIF, codificados por los genes *AIFM2* y *AIFM3* (5,6). La isoforma canónica de hAIF codificada por *AIFM1* posee 613 residuos y un peso de 67 kDa, donde se definen diferentes dominios y secuencias de interés (figura 1A) (7). En el N-terminal, posee una secuencia de localización mitocondrial (MLS), que permite la translocación del precursor de hAIF a la mitocondria, donde esta secuencia es proteolizada. A continuación, hay un dominio transmembrana, que permite a la proteína alojarse en la membrana interna de la mitocondria, exponiendo el C-terminal de la proteína hacia el espacio intermembrana (4). Sin embargo, se ha descrito que un 30% del *pool* de AIF se encuentra asociado a la membrana externa de la mitocondria (8). La proteína se pliega, adquiriendo la estructura correcta para llevar a cabo su función, gracias a la unión del cofactor FAD, formando hAIF maduro de 62 kDa (figura 1B) (4). En esta región expuesta al disolvente, posee el dominio Pyr_redox, que es el dominio con actividad catalítica, y está formado por un sitio de unión a FAD (secuencialmente intermitentes) y dos sitios de unión a NADH: NADH_A y NADH_B (3,9,10). Por último, está el dominio C-terminal (AIF_C), que modula la actividad de AIF (3,7,10).

Originalmente, la proteína fue caracterizada por su papel en la muerte celular programada, ya que se pensaba que participaba en el proceso de apoptosis (11). Sin embargo, durante la primera década del siglo XXI, se descubrió que esta proteína tiene un papel dual en la homeostasis mitocondrial y en la muerte celular programada independiente de caspasas, también llamada parthanatos (3), gracias a estudios en modelos animales de enfermedades (12).

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de enfermedades que pueden darse debido a mutaciones en el DNA mitocondrial o en el DNA nuclear, afectando a la funcionalidad de proteínas mitocondriales (13). Los pacientes que padecen enfermedades mitocondriales, en general, presentan síndromes con fenotipos muy variables, lo que complica el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Además, el mecanismo molecular subyacente de estas patologías no es comprendido completamente (3,13). Mutaciones en el gen *AIFM1* son responsables de algunas de estas patologías mitocondriales y el conocimiento acerca del papel de AIF en condiciones tanto fisiológicas como patológicas es, hoy en día, poco esclarecedor. De todas las mutaciones patológicas descritas, solo unas pocas están caracterizadas, por lo que es complicado establecer una relación genotipo/fenotipo, que, al igual que ocurre en el resto de las enfermedades mitocondriales, es muy variable (14).

Estas enfermedades derivadas de mutaciones en AIF son enfermedades muy poco frecuentes (menos de un caso por millón de habitantes), por lo que son categorizadas como enfermedades raras (15). El estudio y caracterización de estas patologías a nivel molecular permitirían un mejor diagnóstico

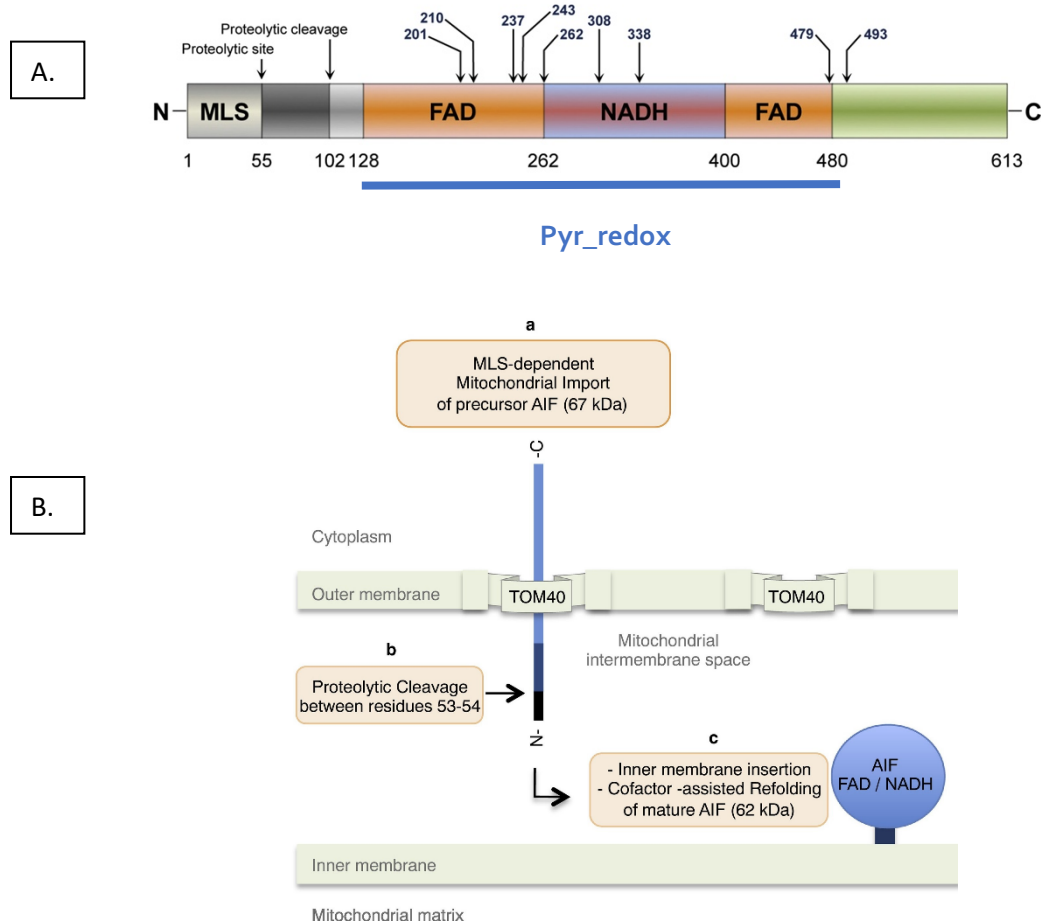


Figura 1 Representación esquemática de hAIF canónico y su función. (A) Organización por dominios de la isoforma canónica de hAIF, donde se indican los residuos donde empiezan y terminan los dominios. Las flechas indican sitios de proteólisis (el del residuo 55 permite la maduración de hAIF una vez haya entrado en la mitocondria, mientras que el segundo permite la liberación de hAIF de la membrana interna de la mitocondria) o algunos residuos en los que se han descrito mutaciones que acarrearán el desarrollo de patología. Figura adaptada de Bano y Prehn 2018. (B) Proceso de maduración de hAIF. (a) El precursor de hAIF de 67 kDa entra en la mitocondria atravesando la membrana externa de la mitocondria gracias al transportador TOM40. (b) El precursor es proteolizado entre los residuos 53 y 54, liberando la MLS. (c) hAIF se inserta en la membrana interna de la mitocondria gracias a su dominio transmembrana y se pliega correctamente gracias al cofactor FAD, formando el hAIF maduro de 62kDa orientado hacia el espacio intermembrana. Figura tomada de Reinhardt et al. 2020.

y, probablemente, encontrar terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes e, incluso, y si fuera posible, curar estas enfermedades. Además, conseguir comprender la fisiopatología de estas enfermedades, permitiría conocer cuál es el papel de AIF en la homeostasis celular y podría permitir conocer la base molecular del resto de patologías mitocondriales.

3. Objetivo

AIF participa tanto en la muerte celular programada como en la homeostasis mitocondrial y celular, sin embargo, el mecanismo molecular de acción en el que participa, principalmente, a nivel de supervivencia celular, no se conoce completamente, por lo que tampoco se conocen los mecanismos moleculares que hay detrás de las patologías mitocondriales producidas por mutaciones en el gen *AIFM1*. En este trabajo, se realiza una revisión de la bibliografía para poder recabar información relevante acerca de AIF y su relación con la fisiología y patología, y así exponer los aspectos más importantes. Para llevar este objetivo a cabo, en primer lugar, se va a realizar una búsqueda de bibliografía e información en bases de datos, utilizando consultas y filtros que permitan encontrar

estudios y revisiones relevantes en este contexto de estudio. Por un lado, se pretende determinar cuál es modelo actual del mecanismo molecular en el que participa AIF, tanto en la supervivencia como en la muerte celular, y cómo mutaciones en el gen que lo codifica pueden producir condiciones patológicas, analizando el impacto de estas mutaciones en la estructura, función o actividad de la proteína en la célula. Por último, también se pretende conocer los modelos animales que existen sobre estas enfermedades producidas por mutaciones en el gen *AIFM1*, y cómo han permitido ayudar a la generación de conocimiento biológico en relación con estas patologías.

Los objetivos más concretos del trabajo son:

- Conocer el papel biológico de AIF, tanto a nivel de supervivencia como de muerte celular, y caracterizar su actividad enzimática.
- Explorar las mutaciones patológicas del gen *AIFM1* descritas, clasificarlas en función de la patología y establecer una relación genotipo/fenotipo.
- Analizar el impacto de las mutaciones patológicas en la expresión, estabilidad y función de la proteína tanto a nivel celular como a nivel estructural.
- Comprender el papel de los modelos animales de enfermedades derivadas de mutaciones en el gen *AIFM1* en el estudio de la fisiopatología de estas patologías.

4. Metodología

4.1 **Búsqueda bibliográfica**

Con el objetivo de recabar información sobre el papel biológico AIF, su relación con las patologías mitocondriales y modelos animales de estas patologías, se han realizado búsquedas en bases bibliográficas generales y específicas (figura 2).

4.1.1 Bases de datos generales

Las bases de datos generales consultadas en este trabajo han sido PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) (16) y *Web of Science* (<https://webofknowledge.com>) (17). En primer lugar, se realizó una lista con los conceptos clave relacionados directamente con AIF, y fueron agrupados en 7 subcategorías de búsqueda (tabla 1). La consulta tenía la siguiente estructura general, para una subcategoría de búsqueda A: ((“*apoptosis inducing factor*”) OR AIF OR *AIFM1*) AND (conceptoA.1 OR conceptoA.2 OR conceptoA.N) NOT allograft¹). Para ciertas subcategorías, el resultado de la búsqueda no fue satisfactorio debido a un exceso o defecto de entradas con respecto a las esperadas, por lo que la consulta fue ligeramente variada (tabla 1).

Una vez realizada la búsqueda, se aplicaron filtros para tratar de limitar el número total de entradas bibliográficas. El cribado permitió seleccionar artículos y revisiones bibliográficas en inglés, que hayan sido publicados en los últimos 7 años y que estén relacionados con la especie humana (este filtro solo es posible aplicarlo en PubMed (16) y no se aplicó para la subcategoría de búsqueda *mouse* ni *enzyme*).

4.1.2 Bases de datos específicas

Se utilizaron 2 bases de datos específicas y curadas, una de modelos de ratón, la *Mouse Genomics Informatics* (MGI; <https://informatics.jax.org>) (18), y una de enfermedades genéticas humanas con herencia mendeliana, OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*; <https://omim.org>)

¹ AIF es el nombre de otra proteína llamada *allograft inflammatory factor*, por lo que, para evitar coincidencias con entradas no relacionadas, se utilizó el operador booleano NOT.

(19) (figura 2). En ambas, la consulta realizada fue “AIFM1”. En el caso de la búsqueda en la *Mouse Genomics Informatics*, se consideraron los alelos de *Aifm1* que habían sido desarrollados con el objetivo de realizar una caracterización fenotípica, bioquímica y patológica del modelo animal.

Tabla 1 Subcategorías de búsqueda, con sus respectivos conceptos claves y consultas realizadas en las bases de datos de Pubmed y *Web of Science*.

Subcategoría de búsqueda	Conceptos clave	Consulta avanzada*
<i>Mutation</i>	<i>mutation, variant, pathology, disease, disorder, neuro-, myo-</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (mutation OR variant) AND (neuro OR myo OR disorder OR disease) NOT allograft
<i>Mitochondria</i>	<i>mitochondria, inner membrane, intermembrane space</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (mitochondria) AND (inner membrane OR intermembrane space) NOT allograft
<i>Disease</i>	<i>disease, disorder, pathology, variant, mutation, mitochondria</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (disease OR disorder OR pathology) AND (variant OR mutation) AND (mitochondria) NOT allograft
<i>Enzyme</i>	<i>oxidoreductase, redox, NADH, flavoprotein, dimerization, CTC</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (oxidoreductase OR redox OR NADH OR flavoprotein) AND (CTC OR dimerization) NOT allograft
OXPHOS	OXPHOS, <i>respiratory chain, mitochondria</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (OXPHOS OR “respiratory chain”) AND mitochondria NOT allograft
<i>Cell death</i>	<i>parthanatos</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (parthanatos) NOT cancer NOT allograft
<i>Mouse</i>	<i>Mouse, mice, knock-out, knock-in</i>	("apoptosis inducing factor" OR AIF OR AIFM1) AND (mouse OR mice) AND (knock-out OR knock-in) NOT allograft

*En la búsqueda en *Web of Science*, antes de la consulta se añadió la etiqueta de campo TS.

4.1.3 Selección crítica

Una vez realizada la búsqueda, usando el gestor de bibliografía Mendeley (20), se eliminaron los duplicados y se eliminaron las referencias no acordes con la temática de este trabajo, y el resto de los artículos fueron abordados (figura 2).

4.1.4 Búsqueda inversa

A partir de los resultados bibliográficos, se realizó una búsqueda inversa, revisando las referencias de interés en los artículos seleccionados

4.2 Creación de una red de interacción

Para poder comprender la importancia de AIF en la fisiología humana, se ha realizado una red de interactómica. En primer lugar, se han consultado las bases de datos de interacciones proteína-proteína Biogrid (21) e IntAct (22), así como el experimento BioPlex (23). Estas interacciones son únicamente de proteínas con AIF, y para generar una red de mayor conectividad, se han cargado las proteínas humanas resultantes de la búsqueda anterior en STRING (24) para generar una red de interacción, con una confianza de la interacción de 0,4 basadas en todas las fuentes de información disponibles por STRING. Esta red fue exportada al software de análisis de redes CytoScape, donde se realizó un análisis estadístico de la red mediante la aplicación NetworkAnalyzer (25). Los resultados detallados del análisis se encuentran en la tabla 1 del anexo.

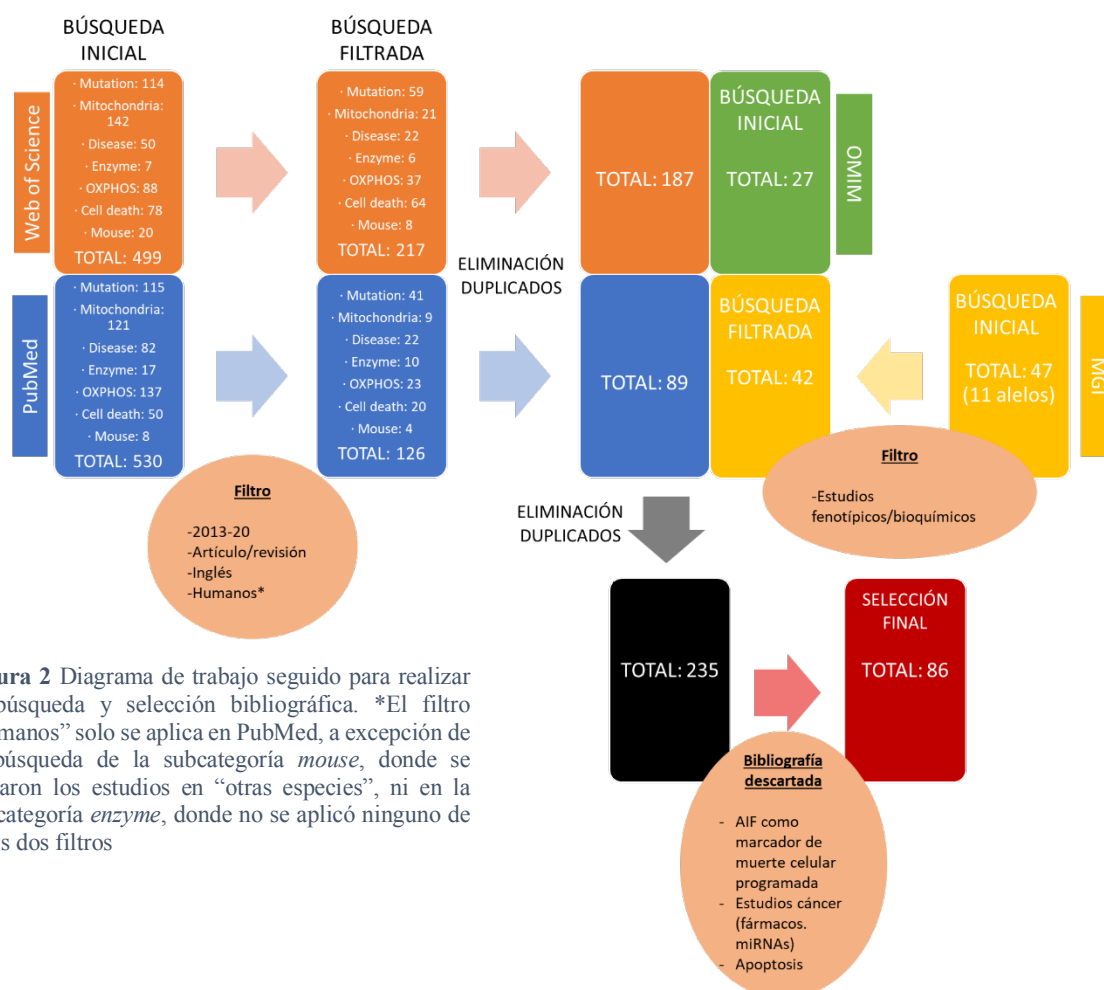


Figura 2 Diagrama de trabajo seguido para realizar la búsqueda y selección bibliográfica. *El filtro “humanos” solo se aplica en PubMed, a excepción de la búsqueda de la subcategoría *mouse*, donde se cribaron los estudios en “otras especies”, ni en la subcategoría *enzyme*, donde no se aplicó ninguno de estos dos filtros

5. Resultados y discusión

5.1 Papel biológico

5.1.1 AIF como oxidorreductasa mitocondrial

AIF es una flavoenzima con actividad oxidorreductasa dependiente de NADH (26). Se trata de una proteína transmembrana (3) y que adquiere una estructura tridimensional adecuada a nivel funcional cuando se une a un nucleótido de FAD (27). *In vitro*, se ha caracterizado que esta enzima es capaz de reducirse gracias a la acción del NADH, que se une a la proteína a través de su dominio Pyr_redox, donde está el sitio de unión del dinucleótido (NADH_A) (27). Esta reducción permite la dimerización del AIF_{red}-NAD⁺ y la formación de un complejo de transferencia de carga (CTC) muy estable frente a la oxidación (10). *In vivo*, hAIF establece un equilibrio monómero-dímero, prevaleciendo la forma dimerica en presencia de NADH (9).

La interacción entre dos proteínas de AIF es necesaria para formar un dímero y, por tanto, para mantener la homeostasis mitocondrial. En esta interacción, cobran especial importancia los residuos H454, del sitio activo de la enzima, y S480, que forma parte de una lámina-β central (posiciones referidas a la proteína humana) (10). En la proteína humana oxidada, hAIF_{ox}, estos dos residuos interaccionan mediante puentes de hidrógeno. La unión de NADH al sitio NADH_A (hAIF_{red}) interrumpe esta interacción, lo que libera a esta lámina-β central, exponiendo una superficie hidrofóbica, a través de la cual van a interaccionar dos monómeros de AIF (figura 3A).

Por otro lado, la reducción de la enzima induce un cambio conformacional del péptido regulador de AIF o *C-loop* del dominio C-terminal, formado por los residuos 510-550. Este péptido regulador se mantiene ordenado, en hAIF_{ox}, gracias a interacciones con el residuo R201 de una horquilla-β (figura 10) con otros residuos de la estructura proteica (10). Esta horquilla-β, forma parte de una estructura llamada *Cβ-clasp*, que también participa en la correcta colocación del péptido regulador en AIF_{ox}. La reducción de la enzima induce un cambio conformacional que provoca el desplazamiento y el desordenamiento del péptido regulador (9), haciendo accesible un segundo sitio de unión a NADH (NADH_B). El hecho de que el NADH module la acción del AIF, permite funcionar a esta oxidoreductasa como un sensor del estado red-ox de la mitocondria (figura 3B).

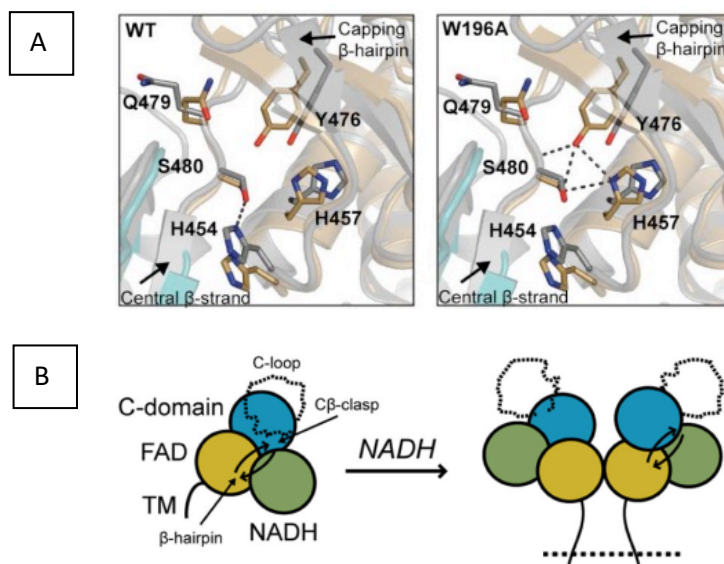


Figura 3 (A) Representación de hAIF_{ox}; $\Delta 1-102$ wild-type (PDB: 4BV6) en *cartoon* gris, y el mutante W196A (permite la dimerización en ausencia de ligando) en *cartoon* marrón y azul, donde algunos residuos relevantes se muestran en varillas. A la izquierda, se observan las interacciones que mantienen los residuos H454 y S480 de la proteína wild-type, y a la derecha las interacciones de estos residuos se interrumpen, y el residuo S480 interacciona con los residuos H457 e Y476. Este induce un cambio conformacional que desplaza a la lámina-β central y a la horquilla-β (indicados con flechas). Los átomos de oxígeno están mostrados en rojo, y los de nitrógeno en azul. (B) Representación esquemática del proceso de dimerización de AIF mediada por la unión de NADH. El dominio transmembrana (línea negra) permite la inserción de AIF en la membrana interna de la mitocondria. El dominio FAD (amarillo) y el dominio NADH (verde) permiten la unión de FAD y NADH, respectivamente. Este último cofactor actúa como efector alostérico, que permite la formación del CTC y la dimerización de AIF. En este proceso, el péptido regulador o *C-loop* del dominio C-terminal (azul) se desplaza. hAIF_{ox} (izquierda) posee una horquilla-β que permite la colocación del péptido regulador gracias a la formación de una estructura denominada *Cβ-clasp*, donde residuos tanto de la horquilla-β, del péptido regulador y del dominio C-terminal establecen puentes de hidrógeno (no se muestra). Figura tomada de Brosey et al. 2016.

5.1.2 Papel de AIF en la homeostasis mitocondrial y celular

El papel de AIF en la muerte celular ha sido ampliamente caracterizado y estudiado, sin embargo, su relación con la supervivencia celular y la homeostasis mitocondrial no fueron descritas hasta comienzos de siglo XXI (28). Previamente, estudios fenotípicos de ratones Harlequin, que expresaban hasta un 80 % menos de AIF, no coincidían con la hipótesis de que AIF participara únicamente en la muerte celular (12). Estos ratones mutantes presentaban un mayor estrés oxidativo en sus neuronas, lo que dio paso a estudios focalizados en determinar el papel del AIF en la supervivencia y homeostasis celular.

Años más tarde se descubrió que AIF permite la expresión e importación al espacio mitocondrial de una proteína llamada CHCHD4 (*Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 4*) (29,30), un homólogo de la proteína Mia40 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se trata de una chaperona del espacio intermembrana que permite el correcto plegamiento de proteínas mitocondriales a través de la formación de puentes disulfuro mediante una oxidación. Experimentos en levadura han determinado

que Mia40 permite la formación de estos puentes disulfuro en proteínas que poseen el motivo de secuencia C-X₉-C duplicado o el motivo de secuencia C-X₃-C duplicado, presente en las proteínas con dominios CHCH (*coiled-coil-helix-coiled-coil*) (31). Entre estas proteínas mitocondriales hay proteínas que forman parte de los complejos I y IV del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) o proteínas del complejo MICOS que permiten la manutención y formación de las crestas mitocondriales. Estos motivos de secuencia también aparecen en la proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (CHCHD1) (32) y en proteínas que participan en el transporte mitocondrial, homeostasis lipídica y señalización mediada por calcio (4). Esto conecta directamente AIF con la homeostasis mitocondrial y explica los fenotipos de los ratones Harlequin. Por otro lado, se ha determinado que la deficiencia de AIF induce la degradación de CHCHD4, pero no ocurre al revés, indicando que el CHCHD4 actúa *downstream* de AIF (29), probablemente, AIF funcione como una proteína de acoplamiento para CHCHD4 (33). El modelo del mecanismo de acción está resumido en la figura 4 (4).

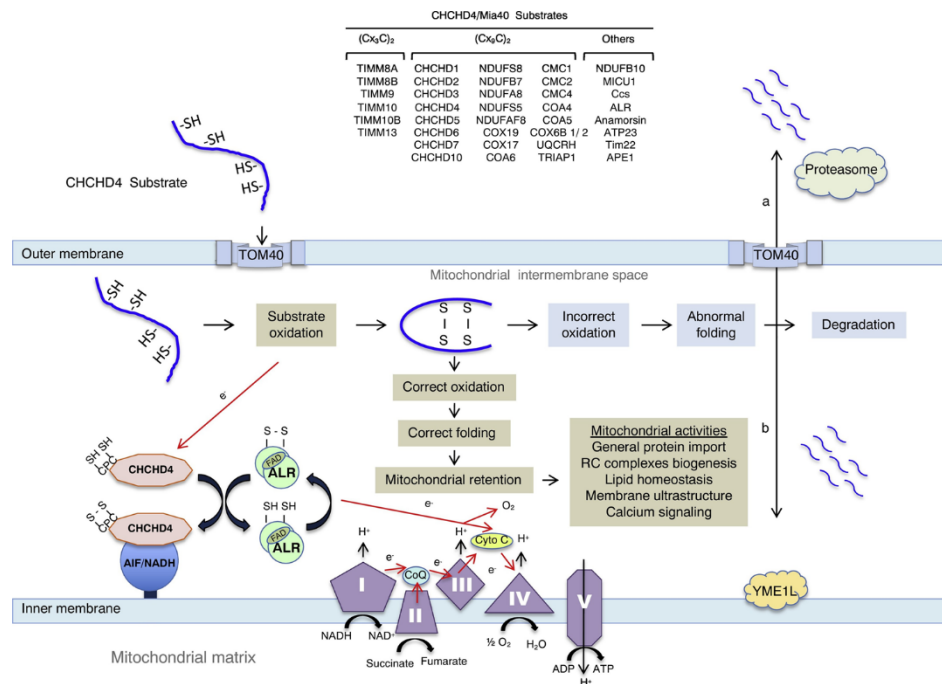


Figura 4 Modelo actual del funcionamiento de AIF y su participación en la homeostasis mitocondrial. Las proteínas son importadas a la mitocondria, entran a través de TOM40 y las que tengan motivos de secuencias reconocibles por CHCHD4, son oxidadas por esta proteína a través de la formación de puentes disulfuro, lo que les permite plegarse correctamente y ejercer su acción. Si no son oxidadas, no se pliegan correctamente, por lo que no pasan el control de calidad de plegado de proteínas. Por tanto, son degradadas (a) directamente en el espacio intermembrana por acción de YME1L o (b) en el citoplasma por acción del proteasoma. Tras la reducción de CHCHD4, se recicla su estado redox gracias a ALR, que también se tiene que volver a oxidar cediendo electrones al citocromo c, al complejo IV o, directamente, al oxígeno. Figura tomada de Reinhardt et al. 2020.

5.1.3 Papel del AIF en la muerte celular

Esta proteína también regula la muerte celular programada, pero no lo hace a través de la apoptosis, sino que participa en un proceso llamado parthanatos, definido como una muerte celular programada independiente de caspasas (11,34).

Esta ruta de muerte celular programada se inicia debido a daños irreparables en el DNA que conducen a la hiperactivación de la poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1). Estos daños al DNA ocurren debido a un estrés provocado por la generación de especies reactivas de oxígeno, radiación ultravioleta o ionizante, agentes alquilantes o, en el caso de las neuronas, por la sobre activación del receptor ionotrópico de glutamato NMDA (34). El receptor NMDA es un canal de calcio que permite la entrada de calcio en las neuronas cuando interacciona con el glutamato, un neurotransmisor estimulador. El

aumento de calcio intracelular activa a las óxido nítrico sintasas neuronales (nNOS), que produce NO y que pueden generar daño en el DNA directamente o reaccionando con el ion superóxido, formando ONOO⁻ (34) (figura 5A).

Si no se ha superado el umbral de daño en el DNA, PARP1 se activa y así mismo, activa otras enzimas mediante ADP-ribosilación, formando polímeros de poli ADP-ribosa (PAR) (34). En caso de hiperactivación, los polímeros de PAR se sintetizan y se acumulan y actúan como un mensajero químico que induce mecanismos de muerte celular (35). Esta enzima utiliza como sustratos ATP y NAD⁺, por lo que la hiperactivación de PARP1 podría llevar a una depleción de estos sustratos (34). El aumento de polímeros de PAR en el citoplasma conlleva la proteólisis de AIF, gracias a la acción de una calpaína (36), formando un AIF truncado (tAIF) o AIF_{Δ1-101} (37). Se ha descrito que el polímero PAR es capaz de activar a Bax (proteína proapoptótica), que se transloca a la membrana externa de la mitocondria para inducir su permeabilización, alterando el potencial de membrana y generando poros MPTP (*membrane permeabilization transition pores*) que permitiría a tAIF abandonar el espacio intermembrana (38). Además, PAR es capaz de interactuar con la membrana externa de la mitocondria, facilitando este proceso (35). A pesar de esto, el *pool* de AIF anclado en la membrana externa de la mitocondria es capaz de inducir la muerte celular programada vía parthanatos, sin necesidad de que ocurra la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (8).

Una vez abandona la mitocondria, la *heat shock protein* 70 (HSP70) interacciona con AIF y lo mantiene en el citoplasma (39), mientras que otras proteínas como la ciclofilina A (CypA) (40) o el factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF) (41) inducen su translocación al núcleo. Por otro lado, tAIF interacciona con la tioredoxina 1 (TXN1), que facilita el mantenimiento del estado reducido de AIF en un entorno oxidativo en el que se da la muerte celular programada (42). Otra interacción que establece AIF es con el factor traduccional de iniciación eucariota 3G (eIF3G), de tal manera que impide su reclutamiento al complejo de iniciación de la traducción, e inhibe, por tanto la síntesis proteica (43). En el núcleo, el complejo AIF:CypA o AIF:MIF es capaz de interactuar con histonas de la familia H2AX (44) y con el DNA (45), lo que conlleva a la condensación de la cromatina y la degradación de la cromatina gracias a la acción de las endonucleasas CypA y MIF (3,41), provocando la muerte celular

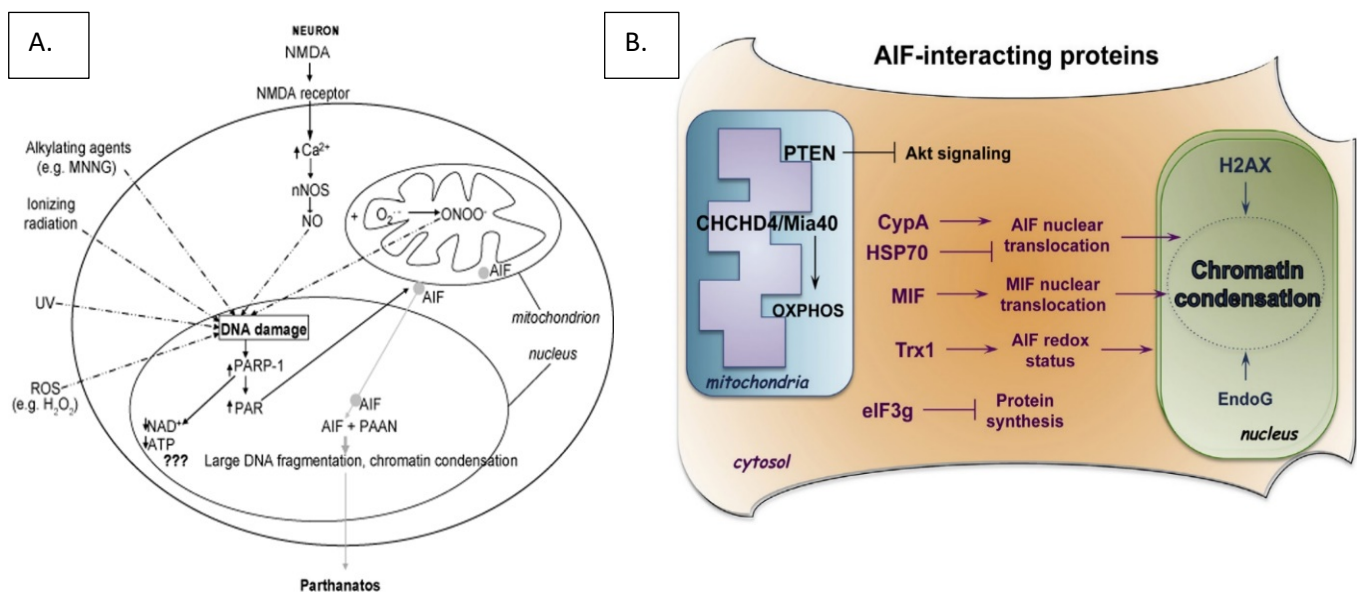


Figura 5 (A) Representación esquemática del proceso de muerte celular programada independiente de caspasas o parthanatos el daño en el DNA. NMDA (N-metil-D-aspartato); UV (ultravioleta); ROS (especies reactivas de oxígeno); PAAN (*parthanatos AIF-associated nuclease*). Figura tomada de Fatokun et al. 2014. (B) Proteínas que interactúan con AIF en la mitocondria, citoplasma y núcleo, así como el efecto que conlleva estas interacciones. Figura tomada de Bano y Prehn 2018.

programada (figura 5B). En invertebrados, AIF interacciona con la endonucleasa G (endoG), lo que permite la degradación del DNA (46), mientras, en mamíferos, la endonucleasa G y AIF son capaces de inducir la degradación de la cromatina de forma independiente (47).

En ausencia de un estrés que conlleve la muerte celular programada, AIF interacciona con el homólogo de la fosfatasa y la tensina (PTEN) mitocondrial, impidiendo que esta se oxide, ya que, PTEN, en un estado reducido, inhibe la ruta de las PI3K/Akt, una ruta señalizadora de supervivencia celular (48) (figura 5B).

5.1.4 Estudio proteómico e interactómico del AIF

AIF es una proteína que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos del cuerpo humano ya que se trata de una proteína mitocondrial y la mitocondria es un orgánulo presente en mayor o menor medida en todos los tejidos. La red de interacción de AIF generada consta de 270 nodos, entre los cuales, AIF presenta un grado y una centralidad superiores a la media del resto de nodos que forman parte de esta red (tabla 2). Esto indica el amplio interactoma de AIF y explica la relevancia biológica de esta proteína. Como ya se ha descrito en varios casos clínicos, mutaciones en AIF que disminuyen su expresión o reducen su actividad biológica conducen a patologías mitocondriales (14). En cambio, el coeficiente de agrupamiento de este nodo está por debajo de la media, es decir, los vecinos directos de AIF en la red interaccionan poco entre sí. Esto podría deberse a que AIF es una proteína bifuncional, y las proteínas con las que interacciona intervienen en procesos moleculares distintos. Las interacciones de AIF con diferentes nodos de la red, así como la confianza de estas interacciones aparecen en la tabla 2 del anexo.

Tabla 2 Valores de centralidad de cercanía, coeficiente de agrupamiento y de grado del nodo correspondiente al AIF con respecto al valor medio de los nodos de la red, obtenidos mediante la aplicación NetworkAnalyzer de Cytoscape

	Centralidad de cercanía	Coeficiente de agrupamiento	Grado
AIF	0,446	0,198	32,0
Media de la red	0,337	0,417	18,4

5.2 Relación con la patología

AIF, desde el punto analítico *in silico*, mediante el análisis de las redes de interacción, es una proteína relevante a nivel biológico, como así indica su alto nivel de grado y centralidad. Por tanto, se puede predecir que mutaciones que afecten a la función biológica que desempeña AIF pueden alterar la homeostasis mitocondrial, y por tanto, la homeostasis celular. Se han descrito diversas patologías humanas debido a mutaciones en el gen *AIFM1*, y todas ellas se caracterizan por ser enfermedades mitocondriales (3,49). Hasta la fecha, se han publicado 28 mutaciones en el gen *AIFM1* que generan condiciones patológicas con consecuencias variables (3,19) (tabla 3). Los principales tejidos afectados son el muscular y el sistema nervioso, como indican los síntomas presentados por los pacientes. Estos tejidos dependen, en gran medida, de la energía en forma de ATP producida a través de la fosforilación oxidativa (2), proceso regulado de forma indirecta por AIF.

Estas mutaciones causan hasta 4 tipos de patologías diferentes: (i) síndrome de Cowchock (MIM: 310490), (ii) deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa 6 (MIM: 300816), (iii) sordera ligada al cromosoma X 5 (MIM: 300614) y (iv) displasia espondiloepimetáfiseal ligada al cromosoma X con leucodistrofia hipomielínica (MIM: 300232) (19). Debido al difícil diagnóstico de estas patologías, hay una mutación que aún no ha sido categorizada en ninguna de las cuatro enfermedades.

5.2.1 Síndrome de Cowchock

El síndrome de Cowchock es una neuropatía progresiva. Se trata de un tipo de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X (3,19). Hasta la fecha, se han descrito 8 mutaciones que derivan en esta patología (tabla 3) (52,53). Esta neuropatía fue descrita por primera vez por Cowchock et al. en 1985 (52) como una neuropatía degenerativa senso-motora hereditaria de tipo II. También se determinó el patrón de herencia ligado al cromosoma X de la patología en la familia identificada. Unos años más tarde se confirmó, mediante diagnóstico genético, que la enfermedad se debe a una mutación en el gen *AIFM1* (53) (codificado en el cromosoma X), más concretamente, la mutación E493V. Esta mutación acarrea una evidente relación genotipo/fenotipo (14). Pacientes portadores de esta mutación empiezan a desarrollar síntomas de la enfermedad durante la infancia y, de forma progresiva, neuropatía axonal senso-motora, sordera, retraso cognitivo, debilidad y atrofia muscular y pérdida sensorial, sobre todo en las extremidades inferiores (52,53). Aparentemente, el sistema OXPHOS no se ve afectado, lo que indica que estos síntomas podrían explicarse por un aumento de la muerte celular independiente de caspasas (53). El residuo ⁴⁹³E forma parte del sitio alostérico NADH_B presente en la forma reducida de la proteína (figura 6) (9). Aunque la mutación no altera el plegamiento de AIF, sí que afecta a la unión con la segunda molécula de NADH, y a la estabilidad del CTC (53), pudiendo aumentar la sensibilidad de AIF a la proteólisis y su liberación de la membrana interna de la mitocondria, aumentando, por tanto, la capacidad inducir la muerte celular programada por la vía parthanatos (53).

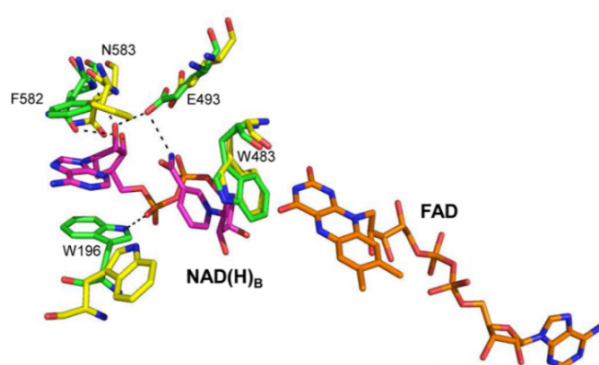


Figura 6 Representación del sitio de unión a NADH_B de hAIF_{Δ1-102}, donde las interacciones intermoleculares se representan a través de líneas discontinuas. Las estructuras químicas están representadas en varillas. Los átomos de C de la molécula de FAD están representados de color naranja, los del NADH en rosa, los de los residuos del sitio de unión a NADH_B de hAIF_{Δ1-102}; ox (PDB: 4BV6) en amarillo y los de los residuos del sitio de unión a NADH_B de hAIF_{Δ1-102}; red:2NADH (PDB: 4BUR) en verde. Figura tomada de Ferreira et al. 2014.

Una segunda mutación causante del síndrome de Cowchock ha sido descrita por Adrissone et al., G262S. En este caso clínico, el paciente también presenta síntomas de forma progresiva, a partir del primer año de vida, que se describían en el estudio inicial: neuropatía axonal, sordera, retraso cognitivo y debilidad muscular (51). Además de estos síntomas, el paciente presenta desde la infancia ataxia sensorial y cerebral, lo que expande el espectro de fenotipos relacionados con este síndrome (51). El residuo G262 se sitúa en la región donde termina el dominio de unión a NADH y comienza el dominio de unión a FAD, con una localización espacial cercana al grupo pirofosfato de la flavina (14). La sustitución por un residuo de serina, más grande y más polar que la glicina, genera un cambio de la estructura del sitio activo de la proteína (figura 7), lo que reduce la estabilidad del complejo AIF_{red}-NAD⁺ comparado con AIF *wild-type* (14). De hecho, la proteína reducida se reoxida 100 veces más rápido en comparación con la proteína *wild-type*, esto podría conducir a que, *in vivo*, no sería capaz de formar interacciones estables y funcionales que permitan la acción *downstream* de CHCHD4, lo que podría relacionarse con un descenso de la expresión de los complejos I y III (un descenso del 40% de la actividad), y sobre todo, del complejo IV del sistema OXPHOS (un descenso del 80% de la actividad) (51). Estudios *in vitro* e *in vivo* de la expresión de los complejos I y IV del sistema OXPHOS con este mutante sugieren un fenotipo más severo del que se observa en la clínica (51). Por otro lado, el mutante G262S se expresa menos a nivel proteico que la proteína *wild-type* (51), lo que también podría explicar

la deficiencia en los complejos respiratorios I y IV. Sin embargo, aún no se sabe a qué se debe esta variabilidad en los síntomas ni tampoco por qué los estudios del mutante G262S sugieren un fenotipo

Tabla 3 Mutaciones en el gen *AIFM1* de importancia clínica y su impacto en la actividad y estabilidad proteica

Mutación	Localización	Patología	Expresión proteica	Descenso actividad OXPHOS	Unión DNA	Muerte celular programada	Actividad redox	Estabilidad hAIF	Referencia
T141L	Sitio unión FAD	COWCK	-	-	-	-	-	-	Heimer et al. 2018 (50)
M171I	Dominio FAD	COWCK	-	-	-	-	-	-	Wang et al. 2018 (54)
ΔR201	Sitio unión NADH _B – horquilla-β	COXPD6	=	CI, CIII, CIV	↑	↑	↑	↓	Ghezzi et al. 2010 (55)
F210L	Dominio FAD – colocación 510-550 (hAIF _{ox})	COWCK	-	CI, CIII	-	-	-	-	Hu et al. 2017 (56)
F210S	Dominio FAD – colocación 510-550 (hAIF _{ox})	COWCK	↓	-	-	=	-	-	Sancho et al (57)
Q235H	Dominio FAD	SEMDHL	↓	-	-	-	-	-	Miyake et al. 2017 (58)
D237G	Dominio FAD	SEMDHL	-	-	-	-	-	-	Mierzevska et al 2017 (59) Kimura-Ohba et al. 2013 (60)
D237V	Dominio FAD	SEMDHL	-	-	-	-	-	-	Miyake et al. 2017 (58)
D240D	Dominio FAD	SEMDHL	↓	-	-	-	-	-	Miyake et al. 2017 (58)
V243L	Dominio FAD	COXPD6	↓	CI, CIII, CIV	-	-	=	-	Kettwig et al. 2015 (49)
T260A	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
G262S	Sitio unión NADH _A – colocación residuos del sitio	COWCK	↓	CI, CIII	-	-	↑	-	Adriessone et al. 2015 (51)
G308E	Sitio de unión NADH _A	COXPD6	-	CI, CIV	-	-	↓	↓	Berger et al. 2011 (62)
G338E	Dominio FAD – colocación 510-550 (hAIF _{red})	COXPD6	↓	CIV	-	-	↓	-	Diodato et al. 2016 (63)
M340T	Sitio de unión NADH _A	COWCK	-	-	-	-	-	-	Heimer et al. 2018 (50)
L344F	Dominio NADH	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
G360R	Dominio NADH	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
R422W	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
R422Q	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
R430C	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
R451Q	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
A472V	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
P475L	Dominio FAD	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
Q479R	Sitio de unión FAD/NADH – Bucle	COXPD6	-	-	-	-	-	-	Morton et al. 2017 (64)
T492H	C.terminal	-	-	-	-	--	-	-	Pronicka et al. 2016 (65)
E493V	C-terminal – Sitio de unión NADH _B	COWCK	=	=	↑	↑	↑	↓	Cowchock et al. 1985 (52) Rinaldi et al. 2012 (53)
I591M	C-terminal	DFNX5	-	-	-	-	-	-	Zong et al. 2015 (61)
IVS6AS, T-G, -44 †	-	SEMDHL	↓	-	-	-	-	-	Miyake et al. 2017 (58) Neubauer et al. 2006 (66)

Adaptado de Bano, D. y Prehn, J. H. M. (2018) (3) y de la base de datos OMIM (19). (COWCK): Síndrome de Cowchock; (COXPD6): deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa 6; (SEMDHL): displasia espondiloepimetáfiseal ligada al cromosoma X con leucodistrofia hipomiélica; (DFNX5): sordera ligada al cromosoma X 5. † Mutación en el intrón 6, 44 nucleótidos downstream del sitio de *splicing* en 5'.

todavía más severo. Se han planteado dos hipótesis: (i) que AIF_{ox} sea capaz de interaccionar en cierta medida con CHCHD4 o (ii) que exista un mecanismo compensatorio o el propio CHCHD4 sea capaz de revertir la función deficiente de AIF (14), evitando que se desestabilice el CTC.

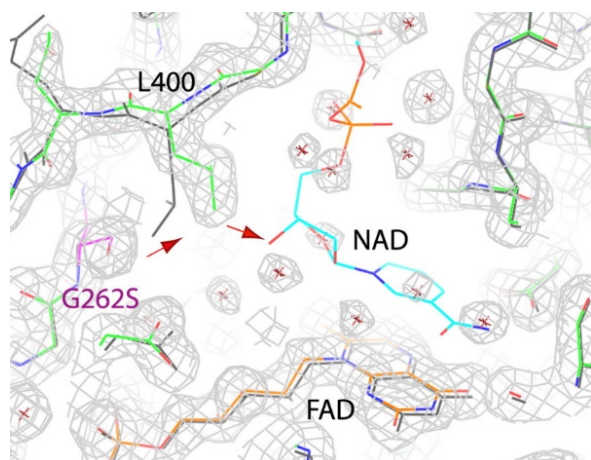


Figura 7 Representación del sitio activo de hAIF_{Δ1-102}. Los átomos de carbono de la molécula de NAD (modelado con respecto a la estructura 4BUR) están mostrados de color cian, los de hAIF_{ox} (PDB: 4BV6) en gris y los de la proteína mutante G262S en verde. Las moléculas de agua son representadas con cruces rojas. Las estructuras químicas están mostradas como líneas. Sitio activo de AIF mostrado con un mapa de densidad electrónica (1,3 σ) de los residuos que lo forman. El residuo S262, debido a choques estéricos, desplaza al residuo L400 (indicado con flechas rojas), acercándolo al NAD y alterando, por tanto, el sitio activo de la proteína. Figura tomada de Sevrioukova 2016.

Por otro lado, están las mutaciones en el residuo F210, que, a pesar de que son sustituciones en el mismo residuo, provocan fenotipos distintos entre los pacientes portadores. La mutación F210L fue descrita por Hu et al. en 2017 (56) en dos hermanos cuyo desarrollo fue normal. Sin embargo, a los 14 años empezaron a desarrollar problemas para andar y fueron diagnosticados con el síndrome de Charcot-Marie-Tooth. Los síntomas fueron evolucionando con los años, presentando debilidad en las manos y en los talones y dolor en los músculos gastrocnemios (gemelos). El segundo paciente también empezó a desarrollar estos síntomas a los 14 años, aunque con el paso de los años, ha desarrollado un fenotipo menos severo. Ambos pacientes fueron diagnosticados con una polineuropatía, a pesar de que no presentan síntomas en el sistema nervioso central u otros órganos, y presentaron un descenso en la expresión de los complejos I y III del sistema OXPHOS de alrededor del 80% en fibroblastos (56). Sin embargo, la mutación F210L no altera la interacción de AIF con CHCHD4 ni con HSP70, que regula la actividad de muerte celular de AIF (56).

En cambio, los portadores de la mutación F210S, descrita por Sancho et al. (57), empezaron a presentar dificultades para andar antes de los 2 años, a pesar de que hasta el primer año de vida, su desarrollo había sido normal. El paciente 1 presentó arreflexia y dificultad para mover el tobillo a los 5 años, y no fue capaz de andar hasta los 6 años (usando órtesis en las piernas), perdiendo la capacidad de caminar a los 11. El paciente 2 consiguió empezar a andar de forma independiente a partir de los 2 años, aunque presentaba debilidad y atrofia muscular en músculos distales, piernas, y manos de forma progresiva. No se detecta un cambio en la apoptosis, pero sí una fragmentación de las mitocondrias, lo que podría indicar una disfunción de la cadena respiratoria de la mitocondria (57).

El residuo F210 se encuentra en la superficie de la proteína, formando parte de una hélice α (figura 8A-8B) y mantiene interacciones hidrófobas con el residuo P207, también de la misma hélice. Además, mantiene interacciones con los residuos Q206, F205 y F144 (figura 8C) (57), permitiendo el correcto plegamiento de la proteína. Esta hélice podría estar involucrada en la correcta colocación de la horquilla- β que, en la forma oxidada de AIF, interacciona con el péptido regulador 510-550, bloqueando el acceso del coenzima al sitio NADH_B. Una sustitución por un residuo serina en la posición 210 podría alterar estas interacciones hidrófobas, desestabilizando la hélice α en la que se encuentra el residuo 210, lo que podría provocar un incorrecto posicionamiento de la horquilla- β , lo que podría afectar a la actividad de la proteína (57). Por otro lado, la sustitución por un residuo de leucina descrita en la mutación F210L parece no generar un fenotipo tan grave como la mutación F210S. Es posible que la

sustitución de la fenilalanina por otro residuo apolar como es la leucina no altere tanto la estructura de la hélice α en la que está el residuo 210, y, por tanto, haya un mayor control de la asociación con el NADH en el sitio NADH_B en comparación con el mutante F210S.

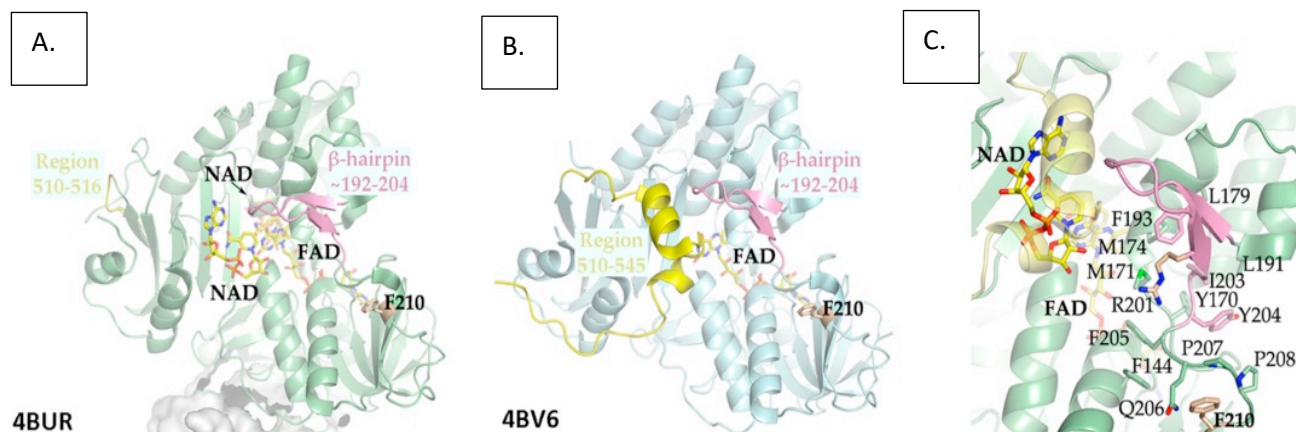


Figura 8 Representación de $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}$ en cartoon. El péptido regulador está representado de color amarillo, la horquilla- β en rosa y el residuo F210 en representado como varilla marrón. El NAD (amarillo) y el FAD (amarillo) están representados en varillas. (A) Representación de $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{red}$ (PDB: 4BUR). (B) Representación de $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{ox}$ (PDB: 4BV6). (C) Superposición de las estructuras $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{red}$ y $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{ox}$, donde se muestra en varillas algunos de los residuos relevantes en el plegamiento global de la proteína, donde se encuentra el residuo F210, que permite la correcta colocación de la estructura gracias a interacciones con P207, Q206, F205 y F144. Figura tomada de Sancho et al. 2017.

El fenotipo generado por la mutación F210L es muy similar a otro descrito por Wang et al. en 2018 (54). Cinco pacientes varones de una familia empezaron a desarrollar durante la infancia una neuropatía senso-motora axonal que se manifestaba en forma de debilidad de las extremidades inferiores, la cual ha ido progresando de forma controlada, desarrollando atrofia muscular en las extremidades inferiores, problemas para caminar de forma normal y pies cavos. Estos pacientes son portadores de la mutación M171I. El residuo M171 está conservado entre las diferentes especies, e interacciona con el residuo I528 (figura 9A), también conservado, que forma parte del péptido regulador. La sustitución por un residuo de isoleucina puede interrumpir o modificar las interacciones de residuos cercanos o con el mismo residuo I528 (figura 9B), lo que podría conllevar una incorrecta colocación del péptido regulador en AIF_{ox} , al igual que ocurría con la mutación F210L.

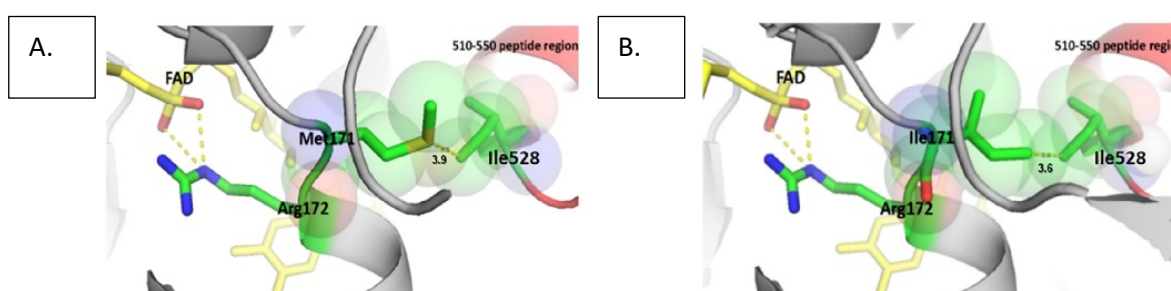


Figura 9 Representación de $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{ox}$ (PDB: 1M6I_A) en cartoon gris. El FAD (amarillo) y los residuos R172, M171, I171 e I528 (verde) mostrados en varillas. El péptido regulador 510-550 está mostrado en cartoon rojo. Los residuos M171, I171 e I528 están representados también forma de esferas transparentes. (A) $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{ox}$ wild-type, donde el residuo M171 interacciona (línea discontinua amarilla) con el residuo I528. (B) $\text{hAIF}_{\Delta 1-102}; \text{ox}$ M171I, donde el residuo I171 podría alterar su interacción con el residuo I528, alterando el posicionamiento y funcionalidad del péptido regulador 510-550. Figura tomada de Wang et al. 2018.

Más recientemente, Heimer et al. (50) han descubierto dos nuevas mutaciones en el gen *AIFM1* que generan el síndrome de Cowchock: M340T y T141I. Los portadores de estas mutaciones no forman parte de la misma familia. El paciente 1, portador de la mutación M340T, empezó a desarrollar sordera a los 5 años debido a una neuropatía del nervio auditorio y con 8 años empezó a presentar problemas para andar, lo que evolucionó en una ataxia. También se le diagnosticó una neuropatía senso-motora y

otros síntomas como pies cavos, dismetría, disartria, arreflexia y bradiquinesia (50). El residuo M340 es cercano al sitio de unión a NADH_A . Esta mutación también ha sido descrita en 8 varones de una misma familia con características fenotípicas diferentes como daltonismo o una afección del nervio radial (67). El paciente 2 es portador de la mutación T141I, y desde la infancia presentaba hipotonía, problemas para hablar y retraso motor, y con 4,5 años desarrolló mioclonía, que fue empeorando con el tiempo, al igual que el trastorno del movimiento (50). También fue diagnosticado de dismetría y ataxia, que, de nuevo, se agravaban con el tiempo. A los 8,5 años fue diagnosticado con una neuropatía auditiva y a los 10,5 años, de una cardiomiopatía. Este residuo T141 forma parte del sitio de unión a FAD y se encuentra en una región conservada de unión a DNA. Estas dos mutaciones amplían el espectro fenotípico debido a mutaciones en AIF y la caracterización de ambas mutaciones permitirá conocer mejor la relación genotipo/fenotipo.

5.2.2 Deficiencia combinada de fosforilación oxidativa 6

La deficiencia combinada de fosforilación oxidativa 6 (COXPD6) es una encefalomiopatía severa que empieza a manifestarse progresivamente durante la infancia causada por mutaciones en el gen *AIFM1*, por lo que la herencia está ligada al cromosoma X. Esta deficiencia se asocia con un desarrollo psicomotor anormal y una deficiencia variable en los complejos del sistema OXPHOS. Se han descrito hasta la fecha 5 mutaciones que causan COXPD6: (i) ΔR201 , (ii) V243L, (iii) G308E, (iv) G338E y (v) Q479R (tabla 3).

El grupo de Ghezzi et al. (55) en 2010 fue el primero en asociar una patología a una mutación en el gen *AIFM1*. Este grupo describió el caso clínico de dos niños varones hijos de dos gemelas monocigóticas que desarrollaron una patología neurodegenerativa en los primeros meses de vida asociada a una disfunción de los complejos proteicos del sistema OXPHOS. Imágenes de resonancia magnética del paciente 1 mostraron señales anormales en el ganglio basal a los 12 meses de vida y, a los 15 meses presentó más síntomas como hipotonía, arreflexia y un retraso en el desarrollo. El paciente fue diagnosticado con una neuropatía senso-motora y se detectó un nivel moderadamente elevado de lactato y piruvato tanto en sangre como el líquido craneoencefálico. La actividad de la cadena respiratoria no pudo determinarse en tejido muscular pero sí en fibroblastos, que presentaban una actividad reducida de los complejos III y IV. El paciente 2 empezó a desarrollar una regresión psicomotora a los 11 meses de vida. Este paciente manifestó anomalías en el cuerpo estriado cerebral en una resonancia magnética, además de presentar irritabilidad, hipotonía, debilidad muscular e hiporreflexia. Se determinó una baja actividad de los complejos del sistema OXPHOS (tabla 3) en el músculo, principalmente, del complejo IV, además de una depleción de mtDNA. Al igual que en el paciente 1, se detectaron niveles elevados de lactato en plasma sanguíneo.

Tanto al paciente 1 como al paciente 2 se les detectó, mediante diagnóstico genético, la mutación ΔR201 en el gen *AIFM1* (55) en la que hay una evidente relación genotipo/fenotipo. El residuo R201 forma parte de la horquilla- β que regula la actividad y que estabiliza dos hélices α cortas (formadas por los residuos 517-524 y 529-533) que impiden el acceso del disolvente al anillo de flavina, que es el sitio de unión de la enzima de NADH_B (figura 10A) (9). La reducción de la enzima por parte de NADH_A induce un cambio conformacional en el que la región 517-533 (que forma parte del péptido regulador 510-550) deja de formar dos hélices α y se desplaza, lo que permite la entrada de NADH_B al sitio alostérico (figura 10B) (9). El residuo R201 interacciona mediante puentes de hidrógeno con T526 y mediante interacciones carga/carga con E531, y la reducción de AIF induce un cambio conformacional que hace que R201 deje de estabilizar las hélices α interaccionando con estos residuos, que pasa a interaccionar con los residuos Y204 y S202 de la propia horquilla- β mediante puentes de hidrógeno (9). La delección de este residuo se traduce en una inestabilidad conformacional, una unión más débil con el

FAD, un incremento de la actividad redox y un aumento en su capacidad de unirse al DNA (lo que favorece la capacidad de AIF de inducir la muerte celular programada vía parthanatos) (9,14,55).

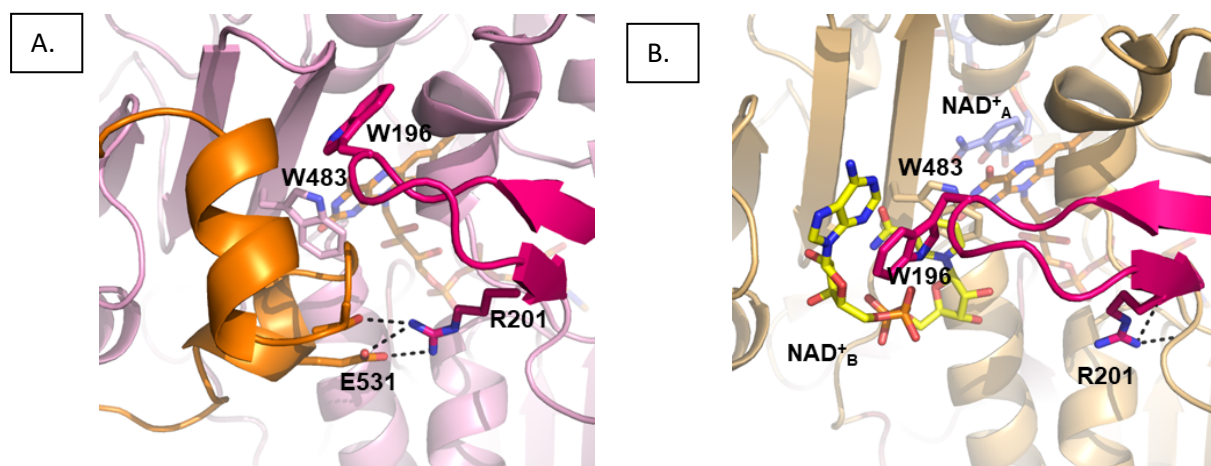


Figura 10 Representación de *cartoon* de (A) hAIF $\Delta 1-102$; ox (rosa claro; PDB) y (B) hAIF $\Delta 1-102$; red:2NADH (marrón) y sus respectivos sitios de unión NADH_B. Las hélices cortas formadas por los residuos 517-524 y 529-533, representadas de color naranja y la horquilla- β representada de color rosa oscuro. El FAD (naranja), NADH_A (azul) y NADH_B (amarillo) están representados en varillas. (A) hAIF $\Delta 1-102$; ox impide el acceso de una molécula de NADH al sitio NADH_B gracias a las hélices 517-524 y 529-533, estabilizadas por el residuo R201 de la horquilla- β . (B) hAIF $\Delta 1-102$; red:2NADH ha cambiado de conformación y las hélices 517-524 y 529-533 se han desplazado (no se muestra), lo que permite la accesibilidad de una molécula de NADH. El residuo W196 de la horquilla- β estabiliza al NADH_B mediante interacciones cuadrupolo/cuadrupolo. Figura tomada de Ferreira et al. 2014.

Otra mutación en la que hay una evidente relación genotipo/fenotipo es descrita por Berger et al. en 2011 (62): G308E, que genera un fenotipo grave y que resultó ser fatal para el paciente portador (14). Esta mutación ha sido identificada en dos pacientes hermanos varones. Mediante pruebas diagnósticas prenatales, se detectó en ambos pacientes una ventriculomegalia, ambos recién nacidos presentaron hipotonía y desarrollaron atrofia muscular (62). Ensayos de histoquímica revelaron una deficiencia en citocromo c mientras que en mitocondrias aisladas se detectó una deficiencia en la actividad de los complejos I y IV del sistema OXPHOS (62). El paciente A falleció a los 4 años debido a un fallo cardíaco producido por una neumonía. El paciente B falleció a los 3 meses debido a una neumonía y a una cardiomiopatología hipertrófica. El residuo G308 forma parte de un motivo de secuencia altamente conservado en el sitio de unión a NADH_A: GXGXXG (11). La mutación G308E no altera la expresión, plegamiento o el potencial red-ox de la proteína, pero reduce la afinidad de AIF por el NADH (figura 11) y, por tanto, la eficiencia de la transferencia de electrones, lo que hace que AIF no sea capaz de formar CTC ni catalizar reacciones red-ox de forma efectiva (14). El residuo mutado de glutamato bloquea el acceso del NADH al sitio de unión y, probablemente, desplace a otros residuos que estabilizan el complejo AIF_{red}-NAD⁺ (14). Esta capacidad de AIF de reducirse y formar un CTC, por tanto, parece clave en la homeostasis celular y mitocondrial.

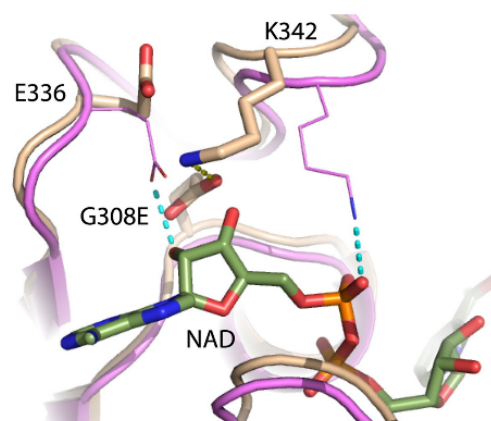


Figura 11 Representación en varillas del sitio de unión NADH_A de hAIF_{red}-NAD⁺ *wild-type* (morado; PDB: 4BUR) y del mutante G308E (beige). Las interacciones con el NAD (verde) se representan con una línea azul discontinua. La sustitución G308E interacciona con el residuo K342 mediante un puente de hidrógeno (no se da en la estructura de la proteína humana 4BUR, pero sí en la proteína de ratón 3GD4, homóloga al 92% a la proteína humana), desplaza al residuo E336 y al NAD, lo que reduce de forma global la afinidad de AIF por el NAD. Figura tomada de Sevrioukova 2016.

Sin embargo, y como es habitual en patologías mitocondriales, se han descrito casos diagnosticados de COXPD6 que presentan variabilidad fenotípica. En 2015, Kettwig et al. (49) describen el caso de un paciente que es portador de la mutación V243L en el gen *AIFM1*. El paciente empezó a presentar síntomas a los 2,5 años de edad, cuando de forma progresiva empezó a perder capacidad auditiva. Desde que empezaron estos síntomas, en tan solo 3 días fue incapaz de escuchar ni de hablar. A los 3 años y 4 meses empezó a presentar ataxia, y pocos meses después, atrofia muscular arreflexia y convulsiones afebriles. A los 5 años empezó a desarrollar ptosis bilateral y a partir de los 10 años no se podía mantener sentado por sí mismo. Ensayos bioquímicos a partir de una biopsia muscular determinaron un descenso en la actividad del complejo I y, en menor medida, del complejo II. El análisis mediante western-blot reportó una baja expresión proteica del complejo I principalmente, pero también de los complejos III y IV del sistema OXPHOS.

La mutación V243L de AIF no genera cambios en el plegamiento, actividad redox o en capacidad de unión al DNA de AIF, y al ser un residuo no expuesto al disolvente, no mantiene interacciones con otras proteínas (14). Sin embargo, y al igual que ocurre con la mutación G262S, hay un descenso de la expresión de AIF (V243L), detectado en la biopsia realizada al paciente, y es posible que sea el causante del desarrollo de la patología (14,49).

En 2016, Diodato et al. (63) descubrieron una nueva mutación en el gen *AIFM1*: G338E, que, de nuevo, expande el espectro fenotípico de COXPD6. Se describen dos pacientes varones hijos de dos hermanas que empezaron a presentar, durante el periodo perinatal, hipotonía y debilidad muscular. En ambos pacientes, en los dos primeros meses de vida, no se producían los reflejos tendinosos profundos, ni en los brazos ni en las piernas, lo que está relacionado con un retraso en el desarrollo general. Pocos meses después, primero el paciente 1 (que presentaba un cuadro ligeramente más severo), empezaron a desarrollar dificultades para tragar y respirar, por lo que tuvieron que someterse a una traqueotomía. Ambos pacientes presentaron atrofia cerebral, unos niveles de plasma ligeramente elevados. El paciente 1 mostró signos de neuropatía motora axonal, y se realizó una biopsia muscular, en la que se determinó una actividad del complejo IV del sistema OXPHOS un 50% menor a la media. Esta biopsia no pudo realizarse al paciente 2, pero la actividad del complejo IV en fibroblastos estaba reducida en un 45% con respecto al control, frente a un 20% de reducción de actividad en fibroblastos con respecto a paciente 1.

El residuo G338 es un residuo altamente conservado que se encuentra en la superficie de la estructura proteica (figura 12A) (63). La mutación G338E altera ligeramente la estructura y la función redox de AIF sin alterar la capacidad de interacción con el DNA (14). La sustitución de un residuo pequeño y neutro por un residuo de mayor tamaño y con carga afecta a la estructura y a la carga electrostática de AIF. La presencia de un residuo de ácido glutámico en la posición 338 puede alterar las interacciones que mantienen los residuos K337 y E346, y este último con el residuo Q556, lo cual puede variar el posicionamiento de la región reguladora 510-550 en la conformación reducida, que se desplaza como consecuencia de esta reducción de AIF para permitir la entrada de una molécula de NADH_B al sitio alostérico (figura 12B) (63). Al margen de estas consideraciones estructurales, hay un descenso de la expresión de AIF en ambos pacientes portadores de la mutaciones (63). A pesar de estos dos factores, el descenso de la actividad del complejo IV del sistema OXPHOS es del 50%, frente a un 80% de descenso descrito en el caso del paciente portador de la mutación G262S (51). Sin embargo, los portadores de la mutación G338E presentan un fenotipo más severo del que se pueden deducir del impacto que pudiera tener la mutación en la proteína y la homeostasis, al contrario de lo que sucede en los portadores de la mutación G262S (14).

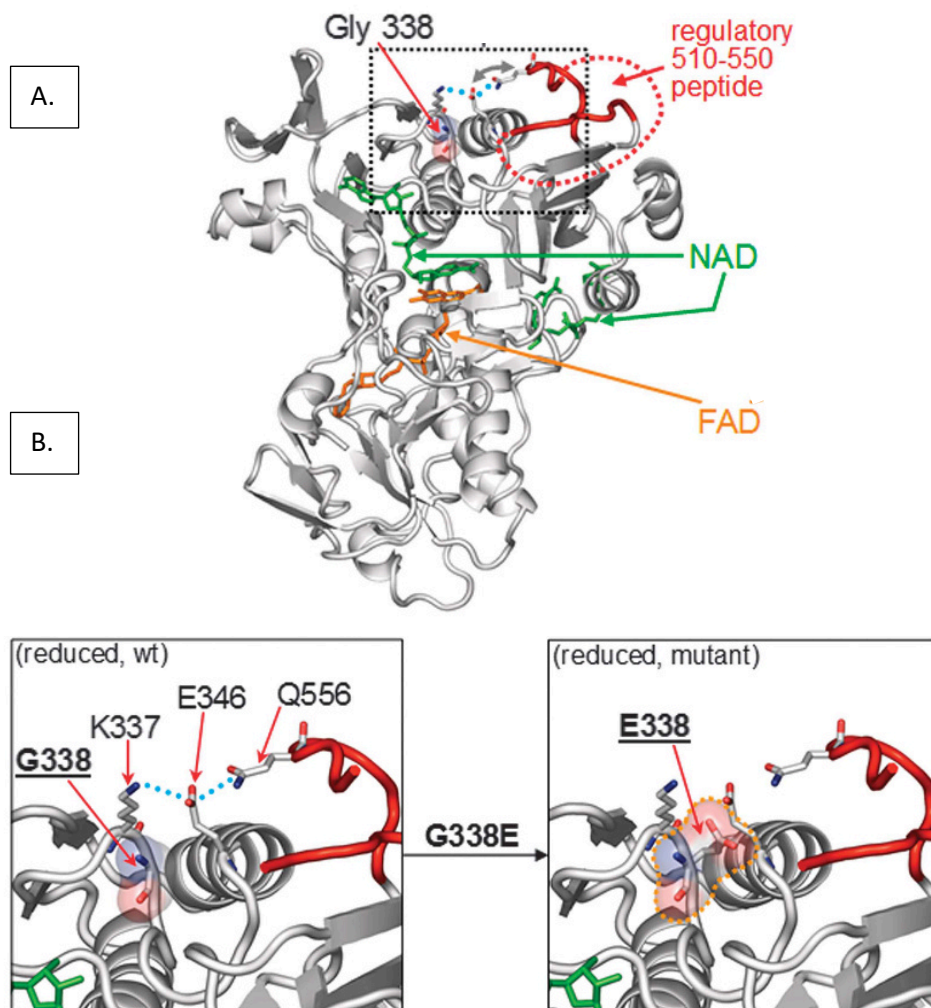


Figura 12 Representación de hAIF $\Delta 1-102$; red:2NADH (PDB: 4BUR) en *cartoon*. Las moléculas de NAD (verde) y FAD (naranja) están mostradas en varillas. El péptido regulador (510-550) está representado de color rojo. (A) estructura de hAIF $\Delta 1-102$; red:2NADH, donde se resalta la posición espacial del residuo ^{338}G en la superficie de la proteína. Mediante un rectángulo interlineado se indica la región que se muestra en (B). (B) En la parte izquierda, se muestra la proteína *wild-type*, donde los residuos G338, K337, E346 y Q556 están mostrados en varillas, y los puentes de hidrógeno como líneas azules discontinuas. En la parte derecha, se representa la proteína con la mutación G338E, marcada con una superficie transparente. El residuo ^{338}E puede alterar la estructura de esta región y también las interacciones entre los residuos que permiten un posicionamiento concreto del péptido regulador. Figura tomada de Diodato et al. 2016.

El último caso reportado de COXPD6 fue descrito por Morton et al. en 2017 (64), y es el caso más severo de todos los descritos en el espectro de patologías provocadas por mutaciones en *AIFM1*, ya que el paciente falleció a los 4 meses de vida. El paciente descrito es un varón que, a los dos días de su nacimiento, presenta hipopnea y cianosis, y los análisis de orina determinaron un elevado nivel de lactato y piruvato. A las 4 semanas de vida, el paciente presentó una neuropatía senso-motora axonal. Este paciente, que se descubrió que era portador de la mutación Q479R, presentaba una actividad normal del sistema OXPHOS, aunque imágenes de microscopía electrónica mostraron mitocondrias irregulares y con una morfología anormal sin inclusiones de la membrana (figura 13). Alteraciones en la ultraestructura de la mitocondria están relacionadas con otras patologías mitocondriales (68).



Figura 13 Imagen de microscopía electrónica de una muestra de tejido muscular del cuádriceps del paciente descrito en Morton et al. 2017. Se aprecian mitocondrias con una forma irregular. La mitocondria indicada con la flecha presenta crestas mitocondriales concéntricas. Figura tomada de Morton et al. 2017.

El residuo Q479 forma parte de un bucle que forma parte tanto del sitio de unión a FAD como a NADH_A y establece interacciones carga/carga con el residuo D443, que también forma parte de un bucle que está localizado en el mismo sitio de unión (figura 14A) (64). Aunque todavía no se ha establecido qué impacto tiene a nivel proteico esta mutación, la sustitución de Q479 por un residuo de arginina no altera la carga global, pero es más voluminoso, lo que puede alterar la estructura del bucle del residuo D443, alterando la afinidad de AIF por NADH y/o FAD (figura 14B) (64). Además, el residuo Q479 es adyacente al residuo S480, clave en cambios conformacionales de AIF y en la dimerización del mismo.

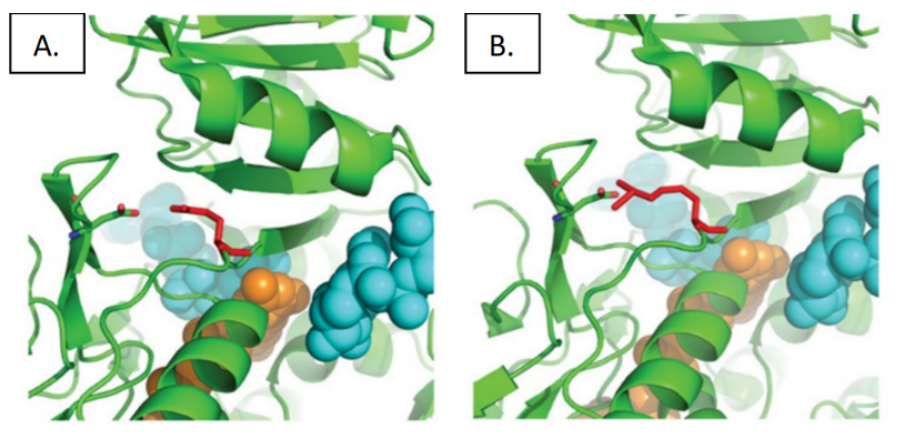


Figura 14 Representación de hAIF $\Delta 1-102$; red:2NADH (PDB: 4BUR) en *cartoon* de color verde. Las moléculas de NADH (azul) y FAD (naranja) están representadas como esferas. El residuo de la posición 479 (tanto la glutamina *wild-type* como la arginina del mutante) está representado como una varilla roja, y el residuo D443 del bucle del sitio de unión está representado como una varilla verde. (A) hAIF *wild-type* donde el residuo Q479 mantiene interacciones carga/carga con el residuo ^{443}D , manteniendo el bucle en la orientación adecuada para mantener estructuralmente el sitio de unión a FAD y NADH. (B) hAIF Q479R donde el residuo de arginina, posiblemente, altere la estructura del bucle, lo que podría conllevar un descenso de la afinidad de hAIF Q479R por el NADH y por el FAD. Figura tomada de Morton et al. 2017.

5.2.3. Displasia espondiloepimetáfiseal ligada al cromosoma X

La displasia espondiloepimetáfiseal ligada al cromosoma X con leucodistrofia hipomielínica (SEMDHL) fue descrita por primera vez en la literatura por Bieganski et al. en 1999 (69), donde describían el caso clínico de 3 varones que presentaban retraso mental y una displasia espondiloepimetáfiseal que afecta a huesos de la columna vertebral y tanto a las epífisis como a las metáfisis de huesos tubulares largos y cortos, lo que da lugar a deformaciones. Estos pacientes también presentaron una hipomielinización de los axones de neuronas, la cual derivó en una neurodegeneración

del sistema nervioso central y periférico. Posteriormente, se han descrito más casos con síntomas similares, en los cuales se asoció esta patología a un patrón de herencia mendeliana ligado al cromosoma X (60,66). Más recientemente, Mierzevska et al., mediante diagnóstico genético, determinaron la presencia de la mutación D237G en el gen *AIFM1* en 4 hermanos varones que presentaban SEMDHL (59). El residuo D237 se encuentra al final del dominio de unión a FAD, sin embargo, su sustitución por un residuo de glicina tiene un impacto a nivel proteico todavía desconocido.

Poco después, Miyake et al. (58), mediante diagnóstico genético, detectaron 4 nuevas mutaciones en el gen *AIFM1* en pacientes de 6 familias diferentes que provocan el desarrollo de SEMDHL, además de la mutación D237G ya descrita. Todas estas mutaciones se encuentran en un intervalo de 70 nucleótidos que abarca el sitio de *splicing* del exón 7. De estas nuevas mutaciones descritas, 2 no alteran la secuencia polipeptídica de AIF. La mutación D240D es probable que genere patología debido a un bajo nivel de expresión de transcrito y de proteína (58). En la mutación IVS6AS, T-G, -44 tampoco hay alteración de la secuencia polipeptídica, ya que se trata de una mutación del punto de ramificación, fundamental en el proceso de *splicing*. Esta mutación induce un descenso significativo de expresión del mRNA, mientras que a nivel proteico no hay apenas expresión de la proteína (58). Las 5 mutaciones descritas en este trabajo (tabla 3) alteran, potencialmente, la maduración del mRNA a nivel del proceso de *splicing* (58).

5.2.4 Sordera ligada al cromosoma X 5

La sordera ligada al cromosoma X (DFNX5) forma parte del espectro de neuropatías auditivas (61) donde hay un defecto en la transmisión de señal desde el oído interno hasta el nervio auditivo. Los pacientes de DFNX5 empiezan a sufrir pérdida auditiva durante la infancia, en estadios más avanzadas de la vida, empiezan a desarrollar, de forma progresiva, una neuropatía periférica (70). Zong et al. (61) determinaron que pacientes varones de DFNX5 de 5 familias distintas son portadores de la mutación R451Q en el gen *AIFM1*. En base a estos resultados, se realizó un *screening* de mutaciones en el gen de otros pacientes con un fenotipo DFNX5, en el que se describieron 10 mutaciones más (tabla 3).

Algunos de los residuos mutados descritos se encuentran cerca tanto de la superficie de interacción de AIF con otras parejas fisiológicas (como la región de interacción 370-394 con CypA (71)) como de la superficie de dimerización con otro monómero de AIF (9) así como del residuo H454, por lo que estas mutaciones podrían alterar la dimerización y la interacción de hAIF con CypA, que es clave en el proceso de muerte celular programada vía parthanatos. Además, el triple mutante de hAIF R413A/R422A/R430A no puede formar dímeros (9). Mutaciones de dos de estos residuos (R422 y R430) se han relacionado con esta patología, por lo que es posible que los pacientes portadores de las mutaciones R422W, R422Q y R430C expresen una proteína hAIF incapaz de formar dímeros con la misma eficacia que la proteína *wild-type*.

5.2.5 Mutación T492H

La variabilidad del fenotipo de estas patologías asociadas a AIF hace que sea complejo diagnosticarlas. En la literatura, se describe 1 mutación que aún no se ha asociado a ninguna patología. Es el caso de la mutación T492H (65), que se describió en un estudio genómico de pacientes con patologías mitocondriales. Tan solo se detectó un paciente portador de esta mutación, y presenta defectos en el sistema OXPHOS y un cuadro con atrofia muscular espinal (65). Se necesitarán más pruebas diagnósticas para determinar la patología que posee el paciente.

5.3 Modelos animales

El uso de modelos animales de patologías humanas es una de las estrategias para poder comprender la fisiopatología de una enfermedad y establecer una relación genotipo/fenotipo. En el caso concreto del espectro de enfermedades causadas por mutaciones en el gen *AIFM1*, el ratón Harlequin

(Hq) ha sido, probablemente, el modelo más importante en la vinculación de AIF a su papel en la homeostasis celular (3), ya que, desde la caracterización de AIF (11), había sido asociado a su papel en la muerte celular programada. De hecho, inicialmente se estudió, principalmente, el papel de AIF en el desarrollo embrionario usando células ES de ratón knock-out de *Aifm1* (72,73), donde la muerte celular programada es un proceso esencial.

5.3.1 Ratón Harlequin

El ratón mutante Harlequin (Hq) fue inicialmente descrito por Barber en 1971 (74). El mutante Hq de la cepa CF-1 se generó consecuencia de una mutación espontánea. No fue hasta 2002 cuando Klein et al. (12) determinaron que el gen *Aifm1* del ratón estaba inactivo debido a una inserción proviral ectópica, que reducía en un 80% el nivel de expresión de transcrito y proteína con respecto a ratones control. Este ratón presenta un fenotipo que no se correlaciona con el papel que por entonces se pensaba que tenía AIF (3): las neuronas de los ratones Hq mueren progresivamente, dando lugar a una enfermedad neurodegenerativa. Esta muerte neuronal es debido a que las neuronas del ratón Hq son más susceptibles al estrés oxidativo (12), lo que indica una posible relación con la homeostasis mitocondrial. Esta funcionalidad de AIF fue apoyada por diversos estudios realizados posteriormente en ratones Hq (28,75).

Por estos motivos, el ratón Hq ha sido utilizado como modelo animal de enfermedades neurodegenerativas (76,77) y demuestra el papel que juega el AIF en la homeostasis celular, sobre todo, en células del sistema nervioso, que son las más afectadas por las patologías causadas en humanos debido a mutaciones en el gen *AIFM1*. Sin embargo, también se ha evaluado el papel de AIF en otros tejidos del ratón Hq, como el riñón, donde se demuestra que la deficiencia del gen *Aifm1* genera lesiones renales debido a una homeostasis mitocondrial aberrante (78). Esto indica la importancia fisiológica que tiene el AIF y la homeostasis mitocondrial en los diversos tejidos del cuerpo.

5.3.2 Mutante Δ ex7

Además del ratón Hq, se han generado otros modelos de ratón knock-out para el gen *Aifm1*. Uno de ellos, derivado de la estirpe Ola, es el knock-out condicional Δ ex7, el cual posee un gen *Aifm1* que presenta una delección en el exón 7, la cual altera el marco de lectura (79). Este mutante fue desarrollado por Joza et al. en 2005 (79) para estudiar la deficiencia de AIF en células musculares, generando alelos deficientes de forma dirigida en tejido muscular mediante el sistema de recombinasas FLP y CRE. Estos ratones presentan disfunción mitocondrial (descenso de la actividad de la cadena respiratoria) atrofia muscular progresiva y cardiopatías (79). Este modelo de *knock-out* condicional también ha sido utilizado para estudiar el papel de la homeostasis mitocondrial y la neurogénesis (80).

5.3.3 Mutante Δ R200

La delección del residuo R201 en hAIF provoca COXPD6 (55). A pesar de ser una mutación estructuralmente bien caracterizada (9), todavía no se conoce cuál es el impacto de esta mutación en la función celular y en la fisiopatología de COXPD6 de forma precisa. Sin embargo, Wischhof et al. (81) generaron un ratón *knock-in* del gen *Aifm1* Δ R200. El residuo de AIF murina R200 es equivalente al residuo R201 de hAIF, por lo que este ratón puede ser utilizado como modelo de la patología humana COXPD6 generada por la mutación Δ R201.

Este modelo de ratón muestra un fenotipo similar al de los pacientes portadores de la mutación Δ R201. Además, a nivel molecular, la mutación Δ R200 provoca una deficiencia de la actividad del sistema OXPHOS, presenta un metabolismo del carbono-1 y del ácido fólico alterado y una hiperactivación de la ruta proliferativa de supervivencia celular Akt/mTOR (81), y que podría estar relacionada con la interacción de AIF con el homólogo de PTEN de ratón.

6. Conclusiones

Tras exponer una revisión de la bibliografía disponible en cuanto al papel de hAIF en la fisiología y patología humana, se puede concluir lo siguiente:

- hAIF es una proteína bifuncional, que participa en la muerte celular programada independiente de caspasas y en la homeostasis mitocondrial.
- Las enfermedades asociadas a hAIF se caracterizan por ser patologías mitocondriales, de fenotipo variable, con un patrón de herencia ligado al cromosoma X.
- La mayoría de las mutaciones patológicas no están caracterizadas, lo que dificulta establecer una relación genotipo/fenotipo.
- Los fenotipos descritos se deben, en su mayoría, a una disfunción del sistema nervioso, lo que da lugar a enfermedades neurodegenerativas.
- Los modelos animales han permitido estudiar el papel bifuncional de hAIF y son una aproximación útil en el estudio de estas patologías.

6. Conclusions

From the bibliographic review regarding the biological function of hAIF in pathologic and physiological conditions, the following conclusions arise:

- *hAIF is a bifunctional protein which participates in caspase-independent programmed cell death and as a mitochondrial housekeeping protein.*
- *Disorders associated to hAIF are mitochondrial pathologies, with a variable phenotype and a X-linked mendelian inheritance.*
- *Most of the pathologic mutations in hAIF are not yet characterized, which makes it complicated to establish a genotype/phenotype relationship.*
- *The phenotypes described are mostly due to a dysfunction in the nervous system, which leads to neurodegenerative disease.*
- *Animal models have been used to study the bifunctional role of hAIF and they are a useful tool in this particular area of research.*

7. Referencias

1. Uzman A, Lodish H, Berk A, Zipursky L, Baltimore D. Molecular Cell Biology (4th edition) New York, NY, 2000, ISBN 0-7167-3136-3. Biochem Mol Biol Educ. 2000;29:Section 1.2The Molecules of Life.
2. Nelson 1942- DL (David L. Lehninger principles of biochemistry. Fourth edition. New York : W.H. Freeman, 2005.; 2005.
3. Bano D, Prehn JHMM. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. EBioMedicine. 2018 Apr 1;30:29–37.
4. Reinhardt C, Arena G, Nedara K, Edwards R, Brenner C, Tokatlidis K, et al. AIF meets the CHCHD4/Mia40-dependent mitochondrial import pathway. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2020;1866(6):165746.
5. Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. Nature. 2019 Nov;575(7784):693–8.
6. Xie Q, Lin T, Zhang Y, Zheng J, Bonanno JA. Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis. J Biol Chem. 2005 May;280(20):19673–81.
7. Delettre C, Yuste VJ, Moubarak RS, Bras M, Robert N, Susin SA. Identification and characterization of AIFsh2, a mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) isoform with NADH oxidase activity. J Biol Chem. 2006 Jul 7;281(27):18507–18.
8. Yu S-W, Wang Y, Frydenlund DS, Ottersen OP, Dawson VL, Dawson TM. Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. ASN Neuro. 2009 Nov;1(5).
9. Ferreira P, Villanueva R, Martínez-Júlvez M, Herguedas B, Marcuello C, Fernandez-Silva P, et al.

- Structural insights into the coenzyme mediated monomer-dimer transition of the pro-apoptotic apoptosis inducing factor. *Biochemistry*. 2014 Jul;53(25):4204–15.
10. Brosey CA, Ho C, Long WZ, Singh S, Burnett K, Hura GL, et al. Defining NADH-Driven Allosteric Regulating Apoptosis-Inducing Factor. *Structure*. 2016/11/03. 2016 Dec 6;24(12):2067–79.
 11. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb;397(6718):441–6.
 12. Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, et al. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 2002 Sep;419(6905):367–74.
 13. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2016 Oct;2:16080.
 14. Sevrioukova IF. Structure/Function Relations in AIFM1 Variants Associated with Neurodegenerative Disorders. *J Mol Biol*. 2016;428(18):3650–65.
 15. Orphanet: an online database of rare diseases and orphan drugs. Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Paris; 1997.
 16. PubMed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 1988.
 17. Web of Science. Philadelphia: Institute for Scientific Information (ISI); 1956.
 18. Smith CM, Hayamizu TF, Finger JH, Bello SM, McCright IJ, Xu J, Baldarelli RM, Beal JS, Campbell JW, Corbani LE, Frost PJ, Lewis JR, Giannatto SC, Miers DB, Shaw DR, Kadin JA, Richardson JE, Smith CL RM. The mouse Gene Expression Database (GXD): 2019 update. *Nucleic Acids Res*. 2019;8;47(D1):D774–D779.
 19. McKusick V. Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD); 1998.
 20. Mendeley Desktop. London, UK.; 2008.
 21. Stark C, Breitkreutz B-J, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D535–9.
 22. Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D358–63.
 23. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, et al. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell*. 2015 Jul 16;162(2):425–40.
 24. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(DATABASE ISS.):433–7.
 25. Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn S-E, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*. 2008 Jan;24(2):282–4.
 26. Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2011/03/10. 2011 Jun 15;14(12):2545–79.
 27. Sorrentino L, Calogero AM, Pandini V, Vanoni MA, Sevrioukova IF, Aliverti A. Key Role of the Adenylate Moiety and Integrity of the Adenylate-Binding Site for the NAD(+)/H Binding to Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor. *Biochemistry*. 2015/11/16. 2015 Dec 1;54(47):6996–7009.
 28. Vahsen N, Candé C, Brière J-J, Béné P, Joza N, Larochette N, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*. 2004 Nov;23(23):4679–89.
 29. Hangen E, Féraud O, Lachkar S, Mou H, Doti N, Fimia GM, et al. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Mol Cell*. 2015;58(6):1001–14.
 30. Modjtahedi N, Hangen E, Gonin P, Kroemer G. Metabolic epistasis among apoptosis-inducing factor and the mitochondrial import factor CHCHD4. *Cell Cycle*. 2015;14(17):2743–7.
 31. Herrmann JM, Riemer J. Three approaches to one problem: protein folding in the periplasm, the endoplasmic reticulum, and the intermembrane space. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul;21(3):438–56.
 32. Modjtahedi N, Kroemer G. CHCHD4 links AIF to the biogenesis of respiratory chain complex I. *Mol Cell Oncol*. 2016 Mar 3;3(2).
 33. Meyer K, Buettner S, Ghezzi D, Zeviani M, Bano D, Nicotera P. Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. *Cell Death Dis*. 2015 Jul;6(7):e1814.
 34. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*. 2014 Apr;171(8):2000–16.
 35. Andrabi SA, Kim NS, Yu S-W, Wang H, Koh DW, Sasaki M, et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006/11/20. 2006 Nov 28;103(48):18308–13.
 36. Shang L, Huang J-F, Ding W, Chen S, Xue L-X, Ma R-F, et al. Calpain: a molecule to induce AIF-mediated necroptosis in RGC-5 following elevated hydrostatic pressure. *BMC Neurosci*. 2014 May;15:63.
 37. Greenwald SH, Pierce EA. Parthanatos as a Cell Death Pathway Underlying Retinal Disease. *Adv Exp*

- Med Biol. 2019;1185:323–7.
38. Narne P, Pandey V, Simhadri PK, Phanithi PB. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 hyperactivation in neurodegenerative diseases: The death knell tolls for neurons. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Mar;63:154–66.
 39. Kondrikov D, Fulton D, Dong Z, Su Y. Heat Shock Protein 70 Prevents Hyperoxia-Induced Disruption of Lung Endothelial Barrier via Caspase-Dependent and AIF-Dependent Pathways. *PLoS One*. 2015 Jun 11;10(6):e0129343–e0129343.
 40. Candé C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, et al. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*. 2004;23(8):1514–21.
 41. Jonas E. The MIFstep in parthanatos. *Science* (80-). 2016;354(6308):36–7.
 42. Shelar SB, Kaminska KK, Reddy SA, Kumar D, Tan C-T, Yu VC, et al. Thioredoxin-dependent regulation of AIF-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 2015 Oct;87:125–36.
 43. Kim J-T, Kim KD, Song EY, Lee HG, Kim JW, Kim JW, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g). *FEBS Lett*. 2006 Nov;580(27):6375–83.
 44. Artus C, Boujrad H, Bouharrou A, Brunelle M-N, Hoos S, Yuste VJ, et al. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J*. 2010/04/01. 2010 May 5;29(9):1585–99.
 45. Wang Y, Kim NS, Haince J-F, Kang HC, David KK, Andrabi SA, et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal*. 2011 Apr 5;4(167):ra20-ra20.
 46. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-Mediated Apoptotic DNA Degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-). 2002;298(5598):1587–92.
 47. Wang Y, An R, Umanah GK, Park H, Nambiar K, Eacker SM, et al. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science*. 2016 Oct;354(6308).
 48. Shen S-M, Guo M, Xiong Z, Yu Y, Zhao X-Y, Zhang F-F, et al. AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation. *EMBO Rep*. 2015 Nov;16(11):1563–80.
 49. Kettwig M, Schubach M, Zimmermann FA, Klinge L, Mayr JAJA, Biskup S, et al. From ventriculomegaly to severe muscular atrophy: expansion of the clinical spectrum related to mutations in AIFM1. *Mitochondrion*. 2015 Mar;21:12–8.
 50. Heimer G, Eyal E, Zhu X, Ruzzo EKK, Marek-Yagel D, Sagiv D, et al. Mutations in AIFM1 cause an X-linked childhood cerebellar ataxia partially responsive to riboflavin. *Eur J Paediatr Neurol EJPJN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2018 Jan;22(1):93–101.
 51. Ardisson A, Piscosquito G, Legati A, Langella T, Lamantea E, Garavaglia B, et al. A slowly progressive mitochondrial encephalomyopathy widens the spectrum of AIFM1 disorders. *Neurology*. 2015 May;84(21):2193–5.
 52. Cowchock FS, Duckett SW, Streletz LJ, Graziani LJ, Jackson LG, Opitz JM, et al. X-linked motor-sensory neuropathy type-II with deafness and mental retardation: A new disorder. *Am J Med Genet*. 1985 Feb 1;20(2):307–15.
 53. Rinaldi C, Grunseich C, Sevrioukova IF, Schindler A, Horkayne-Szakaly I, Lamperti C, et al. Cowchock syndrome is associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet*. 2012 Dec 7;91(6):1095–102.
 54. Wang B, Li X, Wang J, Liu L, Xie Y, Huang S, et al. A novel AIFM1 mutation in a Chinese family with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 4. *Neuromuscul Disord*. 2018 Aug;28(8):652–9.
 55. Ghezzi D, Sevrioukova I, Invernizzi F, Lamperti C, Mora M, D’Adamo P, et al. Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor. *Am J Hum Genet*. 2010/04/01. 2010 Apr 9;86(4):639–49.
 56. Hu B, Wang M, Castoro R, Simmons M, Dortch R, Yawn R, et al. A novel missense mutation in AIFM1 results in axonal polyneuropathy and misassembly of OXPHOS complexes. *Eur J Neurol*. 2017 Dec;24(12):1499–506.
 57. Sancho P, Sánchez-Monteagudo A, Collado A, Marco-Marín C, Domínguez-González C, Camacho A, et al. A newly distal hereditary motor neuropathy caused by a rare AIFM1 mutation. *Neurogenetics*. 2017 Dec;18(4):245–50.
 58. Miyake N, Wolf NI, Cayami FK, Crawford J, Bley A, Bulas D, et al. X-linked hypomyelination with spondylometaphyseal dysplasia (H-SMD) associated with mutations in AIFM1. *Neurogenetics*. 2017 Dec;18(4):185–94.
 59. Mierzevska H, Rydzanicz M, Biegański T, Kosinska J, Mierzevska-Schmidt M, Ługowska A, et al. Spondyloepimetaphyseal dysplasia with neurodegeneration associated with AIFM1 mutation - a novel phenotype of the mitochondrial disease. *Clin Genet*. 2017 Jan;91(1):30–7.
 60. Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, et al. A case

- of cerebral hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet A*. 2013 Jan;161A(1):203–7.
61. Zong L, Guan J, Ealy M, Zhang Q, Wang D, Wang H, et al. Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder. *J Med Genet*. 2015 Aug;52(8):523–31.
 62. Berger I, Ben-Neriah Z, Dor-Wolman T, Shaag A, Saada A, Zenvirt S, et al. Early prenatal ventriculomegaly due to an AIFM1 mutation identified by linkage analysis and whole exome sequencing. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):517–20.
 63. Diodato D, Tasca G, Verrigni D, D'Amico A, Rizza T, Tozzi G, et al. A novel AIFM1 mutation expands the phenotype to an infantile motor neuron disease. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(3):463–6.
 64. Morton SU, Prabhu SP, Lidov HGW, Shi J, Anselm I, Brownstein CA, et al. AIFM1 mutation presenting with fatal encephalomyopathy and mitochondrial disease in an infant. *Cold Spring Harb Mol case Stud*. 2017 Mar;3(2):a001560.
 65. Pronicka E, Piekutowska-Abramczuk D, Ciara E, Trubicka J, Rokicki D, Karkucińska-Więckowska A, et al. New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *J Transl Med*. 2016 Jun;14(1):174.
 66. Neubauer BA, Stefanova I, Hubner CA, Neumaier-Probst E, Bohl J, Oppermann HC, et al. A new type of leukoencephalopathy with metaphyseal chondrodysplasia maps to Xq25-q27. *Neurology*. 2006 Aug;67(4):587–91.
 67. Bogdanova-Mihaylova P, Alexander MDMD, Murphy RPRPRP, Chen H, Healy DGDG, Walsh RARA, et al. Clinical spectrum of AIFM1-associated disease in an Irish family, from mild neuropathy to severe cerebellar ataxia with colour blindness. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS United States*; Dec, 2019 p. 348–53.
 68. Vincent AE, Ng YS, White K, Davey T, Mannella C, Falkous G, et al. The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Sci Rep*. 2016 Aug 10;6:30610.
 69. Bieganski T, Dawydzik B, Kozlowski K. Spondylo-epimetaphyseal dysplasia: a new X-linked variant with mental retardation. *Eur J Pediatr*. 1999 Oct;158(10):809–14.
 70. Wang QJ, Li QZ, Rao SQ, Lee K, Huang XS, Yang WY, et al. AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3. Vol. 43, *Journal of medical genetics*. England; 2006. p. e33.
 71. Farina B, Di Sorbo G, Chambery A, Caporale A, Leoni G, Russo R, et al. Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction. *Sci Rep*. 2017 Apr;7(1):1138.
 72. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549–54.
 73. Brown D, Yu BD, Joza N, Benit P, Meneses J, Firpo M, et al. Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun;103(26):9918–23.
 74. Barber R. B. Two new mutations. *Mouse News Lett*. 1971;45:34–5.
 75. Stringer JR, Larson JS, Fischer JM, Stringer SL. Increased mutation in mice genetically predisposed to oxidative damage in the brain. *Mutat Res*. 2004 Nov;556(1–2):127–34.
 76. Chung S-H, Calafiore M, Plane JM, Pleasure DE, Deng W. Apoptosis inducing factor deficiency causes reduced mitofusion 1 expression and patterned Purkinje cell degeneration. *Neurobiol Dis*. 2011 Feb;41(2):445–57.
 77. Kulic L, Wollmer MA, Rhein V, Pagani L, Kuehnle K, Cattapoel S, et al. Combined expression of tau and the Harlequin mouse mutation leads to increased mitochondrial dysfunction, tau pathology and neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 2011 Oct;32(10):1827–38.
 78. Coughlan MT, Higgins GC, Nguyen T-VV, Penfold SA, Thallas-Bonke V, Tan SM, et al. Deficiency in apoptosis-inducing factor recapitulates chronic kidney disease via aberrant mitochondrial homeostasis. *Diabetes*. 2016/01/28. 2016 Apr 1;65(4):1085–98.
 79. Joza N, Oudit GY, Brown D, Benit P, Kassiri Z, Vahsen N, et al. Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(23):10261–72.
 80. Khacho M, Clark A, Svoboda DS, MacLaurin JG, Lagace DC, Park DS, et al. Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. *Hum Mol Genet*. 2017 Sep;26(17):3327–41.
 81. Wischhof L, Gioran A, Sonntag-Bensch D, Piazzesi A, Stork M, Nicotera P, et al. A disease-associated Aifm1 variant induces severe myopathy in knockin mice. *Mol Metab*. 2018 Jul 1;13:10–23.

8. Anexo

Tabla 1 Resultados estadísticos resultado del análisis de la red de interacción en cytoscape

Descriptor	Valor
Coefficiente de clustering	0,417
Diámetro	7
Radio	4
Centralización	0,263
Camino corto característico	2,779
Grado de nodo medio	18,844
Número de nodos	270
Densidad	0,070
Heterogeneidad	0,981

Tabla 2 Nodos que interaccionan con AIF y el score total y desglosado de las interacciones de STRING

Proteína	Cercanía cromosómica	Fusión génica	Ocurrencia filogenética	Homología	Coexpresión	Interacción experimental	Anotado en bases de datos	Textmining	Score total
ERLIN2	0	0	0	0	0	0.130	0	0.646	0.679
DLD	0.072	0	0	0	0.183	0.458	0	0.127	0.593
TIMM10	0	0	0	0	0.082	0.110	0	0.538	0.590
HTRA2	0	0	0	0	0.061	0.111	0	0.540	0.583
PPIF	0	0	0	0	0.055	0.108	0	0.485	0.528
UQCRC2	0	0	0	0	0.065	0.099	0	0.424	0.473
COX15	0	0	0	0	0.064	0.103	0	0.416	0.467
UQCRC1	0	0	0	0	0.093	0.099	0	0.399	0.466
TOMM22	0	0	0	0	0.061	0.068	0	0.401	0.430
TDRD1	0.045	0	0	0	0.055	0.412	0	0.043	0.424
CPOX	0	0	0	0	0.088	0.387	0	0	0.417
SDHA	0.072	0	0	0	0.079	0.067	0	0.337	0.401
ENDOG	0	0	0	0	0.061	0.757	0	0.860	0.965
PARP1	0	0	0	0	0.061	0	0.900	0.642	0.963
PPIA	0	0	0	0	0.055	0.458	0.800	0.260	0.914
TOMM40	0	0	0	0	0.140	0.807	0	0.082	0.834
NDUFS5	0	0	0	0	0.061	0.777	0	0.129	0.801
H2AFX	0	0	0	0	0	0.207	0.600	0.230	0.734
TUFM	0	0	0	0	0.103	0.328	0	0.578	0.723
CYCS	0	0	0	0	0.066	0.111	0	0.671	0.703
OXSR1	0	0	0	0	0	0.694	0	0.045	0.695
PDHA1	0.049	0	0	0	0.546	0.046	0	0.201	0.627
FAM91A1	0	0	0	0	0.067	0.540	0	0	0.552
KANK2	0	0	0	0	0.055	0.294	0	0.380	0.550
THAP4	0	0	0	0	0	0.549	0	0	0.549
ATP5C1	0.042	0	0	0	0.068	0.069	0	0.516	0.544
MRPS22	0	0	0	0	0.095	0.063	0	0.500	0.539
HSPA1A	0	0	0	0	0.061	0.379	0	0.252	0.526
CHCHD4	0	0	0	0	0.062	0.107	0	0.477	0.523
PGAM5	0	0	0	0	0.064	0.328	0	0.165	0.429
ATP5L	0	0	0	0	0.061	0.111	0	0.348	0.408
NDUFS1	0.135	0	0	0	0.108	0.070	0	0.268	0.404

